

## Humanized green fluorescent protein genes and methods

**Patent number:** JP2000503536T  
**Publication date:** 2000-03-28  
**Inventor:**  
**Applicant:**  
**Classification:**  
**- international:** C12N15/09; C12Q1/68; G01N33/48; C07K14/435;  
C07K14/47; C07K19/00; C12N15/09; C12R1/91;  
C12N5/10; C12P21/02; C12Q1/02  
**- european:** C07K14/435A5; C12N15/87  
**Application number:** JP19970526204T 19970117  
**Priority number(s):** WO1997US00755 19970117; US19960588201  
19960118

### Also published as:



WO9726333 (A1)  
EP0874903 (A1)  
US5874304 (A1)  
EP0874903 (B1)  
AU730842 (B2)

Report a data error here

Abstract not available for JP2000503536T

Abstract of corresponding document: **US5874304**

Disclosed are synthetic and "humanized" versions of green fluorescent protein (GFP) genes adapted for high level expression in mammalian cells, especially those of human origin. Base substitutions are made in various codons in order to change the codon usage to one more appropriate for expression in mammalian cells. Recombinant vectors carrying such humanized genes are also disclosed. In addition, various methods for using the efficient expression of humanized GFP in mammalian cells and in animals are described.

---

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

BEST AVAILABLE COPY

【添付書類】

36 364

刊行物 6 /

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2000-503536

(P2000-503536A)

(43) 公表日 平成12年3月28日 (2000.3.28)

(51) Int.Cl.	識別記号	F I	キーワード (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 0 7 K 14/435		C 0 7 K 14/435	
14/47		14/47	
19/00		19/00	
C 1 2 N 5/10		C 1 2 P 21/02	C

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全140頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平9-528204  
 (88) (22) 出願日 平成9年1月17日 (1997.1.17)  
 (85) 翻訳文提出日 平成10年7月17日 (1998.7.17)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US97/00755  
 (87) 国際公開番号 WO97/26333  
 (87) 国際公開日 平成9年7月24日 (1997.7.24)  
 (31) 優先権主張番号 08/588,201  
 (32) 優先日 平成8年1月18日 (1996.1.18)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 ユニバーシティ オブ フロリダ リサーチ  
 ファウンデーション, インコーポレイ  
 テッド  
 アメリカ合衆国 フロリダ 32611, ゲイ  
 ンズビル, グリントー ホール 223  
 (72) 発明者 ソロツキン, セルゲイ  
 アメリカ合衆国 フロリダ 32608, ゲイ  
 ンズビル, エス. ダブリュー. 38 ティーエ  
 イチ ストリート 3811-59  
 (74) 代理人 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト化グリーン蛍光タンパク質遺伝子および方法

## (57) 【要約】

哺乳動物細胞、特にヒト起源の細胞における高レベル発現に適合させた、合成および「ヒト化」型のグリーン蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子が開示される。塩基置換が、コドンの使用を哺乳動物細胞における発現により1つ以上の適切な使用に変化させるために、種々のコドンにおいてなされる。このようなヒト化遺伝子を保有する組換えベクターがまた、開示される。さらに、哺乳動物細胞および動物におけるヒト化GFPの効果的な発現を用いるための種々の方法が記載される。

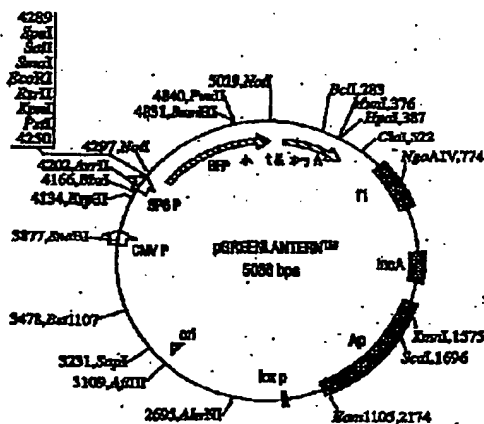


FIG. 10

【特許請求の範囲】

1. ヒト化グリーン蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子。
2. 前記遺伝子が、配列番号2のアミノ酸配列を有するグリーン蛍光タンパク質をコードする。請求項1に記載のヒト化GFP遺伝子。
3. 前記遺伝子が、配列番号2のアミノ酸配列を有するグリーン蛍光タンパク質をコードし、65位のセリンをトレオニンに置換した。請求項1に記載のヒト化GFP遺伝子。
4. 前記遺伝子が、配列番号2のアミノ酸配列を有するグリーン蛍光タンパク質をコードする遺伝子であって、88位のチロシンをヒスチジンに置換した。請求項1に記載のヒト化GFP遺伝子。
5. 前記遺伝子が、配列番号2のアミノ酸配列を有するグリーン蛍光タンパク質をコードする遺伝子であって、64位と88位の間の残基Ser Tyr Gly of Glu (配列番号4) を配列Met Gly Tyr Gly Val Leu (配列番号5) に置換した。請求項1に記載のヒト化GFP遺伝子。
6. 前記コドン位置の少なくとも約10%がヒト化コドンを含む。請求項1に記載のヒト化GFP遺伝子。
7. 前記コドン位置の少なくとも約15%がヒト化コドンを含む。請求項6に記載のヒト化GFP遺伝子。
8. 前記コドン位置の少なくとも約20%がヒト化コドンを含む。請求項7に記載のヒト化GFP遺伝子。
9. 前記コドン位置の少なくとも約25%がヒト化コドンを含む。請求項8に記載のヒト化GFP遺伝子。
10. 前記コドン位置の少なくとも約30%がヒト化コドンを含む。請求項9に記載のヒト化GFP遺伝子。
11. 前記コドン位置の少なくとも約35%がヒト化コドンを含む。請求項10に記載のヒト化GFP遺伝子。
12. 前記コドン位置の少なくとも約40%がヒト化コドンを含む。請求項11に記載のヒト化GFP遺伝子。

23. 前記遺伝子が、配列番号1の野生型クラゲ遺伝子配列と比較して、増加した数のGCGグルタミン酸コードコドンを含む。請求項1に記載のヒト化GFP遺伝子。
24. 前記遺伝子が、配列番号1の野生型クラゲ遺伝子配列と比較して、増加した数のTTCフェニルアラニンコードコドンを含む。請求項1に記載のヒト化GFP遺伝子。
25. 前記遺伝子が、配列番号1の野生型クラゲ遺伝子配列と比較して、増加した数のGCGグリシンコードコドンを含む。請求項1に記載のヒト化GFP遺伝子。
26. 前記遺伝子が、配列番号1の野生型クラゲ遺伝子配列と比較して、増加した数のGACヒスチジンコードコドンを含む。請求項1に記載のヒト化GFP遺伝子。
27. 前記遺伝子が、配列番号1の野生型クラゲ遺伝子配列と比較して、増加した数のGCTイソロイシンコードコドンを含む。請求項1に記載のヒト化GFP遺伝子。
28. 前記遺伝子が、配列番号1の野生型クラゲ遺伝子配列と比較して、増加した数のAGGリジンコードコドンを含む。請求項1に記載のヒト化GFP遺伝子。
29. 前記遺伝子が、配列番号1の野生型クラゲ遺伝子配列と比較して、増加した数のGTAまたはGTCロイシンコードコドンを含む。請求項1に記載のヒト化GFP遺伝子。
30. 前記遺伝子が、配列番号1の野生型クラゲ遺伝子配列と比較して、増加した数のACAアスパラギンコードコドンを含む。請求項1に記載のヒト化GFP遺伝子。
31. 前記遺伝子が、配列番号1の野生型クラゲ遺伝子配列と比較して、増加した数のGCAまたはGTAアロニンコードコドンを含む。請求項1に記載のヒト化GFP遺伝子。
32. 前記遺伝子が、配列番号1の野生型クラゲ遺伝子配列と比較して、増加した数のGCGグルタミンコードコドンを含む。請求項1に記載のヒト化GFP遺伝子。

13. 前記遺伝子が、GFP遺伝子配列のコドン位置18, 53, 93, 125, 150, 176, 195, 204, 235, および234に位置する10個のコドンからの少なくとも7個のヒト化コドンを含む。請求項1に記載のヒト化GFP遺伝子。
14. 前記遺伝子が、GFP遺伝子配列のコドン位置18, 53, 93, 125, 150, 176, 195, 204, 235, および234に位置する10個のコドンからの少なくとも8個のヒト化コドンを含む。請求項13に記載のヒト化GFP遺伝子。
15. 前記遺伝子が、GFP遺伝子配列のコドン位置18, 53, 93, 125, 150, 176, 195, 204, 235, および234に位置する10個のコドンからの少なくとも9個のヒト化コドンを含む。請求項14に記載のヒト化GFP遺伝子。
16. 前記遺伝子が、GFP遺伝子配列のコドン位置18, 53, 93, 125, 150, 176, 195, 204, 235, および234の各々で1個のヒト化コドンを含む。請求項15に記載のヒト化GFP遺伝子。
17. 前記遺伝子が、GFP遺伝子配列のコドン位置18, 53, 125, 176, 195, および235でヒト化ロイシンコードGTC, CTT, またはTTGのいずれか一つを含む。請求項13に記載のヒト化GFP遺伝子。
18. 前記遺伝子が、GFP遺伝子配列のコドン位置93, 150, および234でヒト化バリンコードGTCを含む。請求項13に記載のヒト化GFP遺伝子。
19. 前記遺伝子が、GFP遺伝子配列のコドン位置204でヒト化セリンコードTCTを含む。請求項13に記載のヒト化GFP遺伝子。
20. 前記遺伝子が、配列番号1の野生型クラゲ遺伝子配列と比較して、増加した数のGCAまたはGTAアラニンコードコドンを含む。請求項1に記載のヒト化GFP遺伝子。
21. 前記遺伝子が、配列番号1の野生型クラゲ遺伝子配列と比較して、増加した数のTCAスチンコードコドンを含む。請求項1に記載のヒト化GFP遺伝子。
22. 前記遺伝子が、配列番号1の野生型クラゲ遺伝子配列と比較して、増加した数のACAアスパラギンコードコドンを含む。請求項1に記載のヒト化GFP遺伝子。

- た数のGCGグルタミンコードコドンを含む。請求項1に記載のヒト化GFP遺伝子。
33. 前記遺伝子が、配列番号1の野生型クラゲ遺伝子配列と比較して、増加した数のGCA, AGA, またはGGAアルギンコードコドンを含む。請求項1に記載のヒト化GFP遺伝子。
34. 前記遺伝子が、配列番号1の野生型クラゲ遺伝子配列と比較して、増加した数のGTAまたはGTCセリンコードコドンを含む。請求項1に記載のヒト化GFP遺伝子。
35. 前記遺伝子が、配列番号1の野生型クラゲ遺伝子配列と比較して、増加した数のAGTトレオニンコードコドンを含む。請求項1に記載のヒト化GFP遺伝子。
36. 前記遺伝子が、配列番号1の野生型クラゲ遺伝子配列と比較して、増加した数のGTCまたはGTTバリンコードコドンを含む。請求項1に記載のヒト化GFP遺伝子。
37. 前記遺伝子が、配列番号1の野生型クラゲ遺伝子配列と比較して、増加した数のTACチロシンコードコドンを含む。請求項1に記載のヒト化GFP遺伝子。
38. 前記遺伝子が、TGA終止コドンを含む。請求項1に記載のヒト化GFP遺伝子。
39. 前記遺伝子が、配列番号1の野生型クラゲ遺伝子配列と比較して、減少した数のGTAアラニンコードコドンを含む。請求項1に記載のヒト化GFP遺伝子。
40. 前記遺伝子が、配列番号1の野生型クラゲ遺伝子配列と比較して、減少した数のGCGグリシンコードコドンを含む。請求項1に記載のヒト化GFP遺伝子。
41. 前記遺伝子が、配列番号1の野生型クラゲ遺伝子配列と比較して、減少した数のGTC, CTT, またはTTAロイシンコードコドンを含む。請求項1に記載のヒト化GFP遺伝子。

3

42. 前記遺伝子が、配列番号1の野生型クレンジン遺伝子配列と比較して、減少した数のAGAアルギニンコードコドンを含み、請求項1に記載のヒト化GFP遺伝子。
43. 前記遺伝子が、配列番号1の野生型クレンジン遺伝子配列と比較して、減少した数のGTA、TAA、またはTGAセリンコードコドンを含み、請求項1に記載のヒト化GFP遺伝子。
44. 前記遺伝子が、配列番号1の野生型クレンジン遺伝子配列と比較して、減少した数のGTTまたはGTAバリンコードコドンを含み、請求項1に記載のヒト化GFP遺伝子。
45. 前記遺伝子が、Kozakコンセンサス配列の下流に作動可能に位置する、請求項1に記載のヒト化GFP遺伝子。
46. 前記遺伝子が、配列番号3の核酸配列を含む、請求項1に記載のヒト化GFP遺伝子。
47. 前記遺伝子が、タンパク質コード領域配列に作動可能に連結する、請求項1に記載のヒト化GFP遺伝子。
48. 前記遺伝子が、哺乳動物細胞において標準的なプロモーターの転写制御下に位置する、請求項1に記載のヒト化GFP遺伝子。
49. 組換えベクターとしてさらに規定される、請求項48に記載のヒト化GFP遺伝子。
50. プロモーターの下流に作動可能に位置するヒト化GFPレポーター遺伝子を含む、前記プロモーターが哺乳動物細胞においてヒト化GFP遺伝子の発現を誘引する、発現ベクター。
51. 前記プロモーターが構成プロモーターである、請求項50に記載の発現ベクター。
52. 前記プロモーターがウイルスプロモーターである、請求項50に記載の発現ベクター。
53. 前記プロモーターが、BSV、TL、SV40、CMV、または $\beta$ アクチンプロモーターである、請求項50に記載の発現ベクター。

54. 前記プロモーターがGFPプロモーターである、請求項53に記載の発現ベクター。
55. 前記プロモーターが、標準プロモーターである、請求項50に記載の発現ベクター。
56. 前記プロモーターが、テトラムチン、熱ショックタンパク質、メタロチオネインまたはエストロゲン遺伝子プロモーター、放射線誘導 (radiation-inducible) プロモーター、またはtelomeraseプロモーターである、請求項55に記載の発現ベクター。
57. 前記プロモーターが、組織特異的プロモーターである、請求項50に記載の発現ベクター。
58. 前記プロモーターが、FAB、インスリン、トランスフェリン、 $\alpha 1$ -抗リブリン、PAI-1、アポリポタンパク質AII、IL6レセプター、GFP、GFP10、または $\beta$ グロブリンプロモーターである、請求項57に記載の発現ベクター。
59. 前記発現ベクターが、複製のクロニング係数をさらに含む、請求項50に記載の発現ベクター。
60. 前記発現ベクターが、前記プロモーターと前記ヒト化GFP遺伝子との間に作動可能に位置された複製のクロニング部位を含む、請求項59に記載の発現ベクター。
61. 前記発現ベクターが、前記ヒト化GFP遺伝子の下流に作動可能に位置された複製のクロニング部位を含む、請求項59に記載の発現ベクター。
62. 前記発現ベクターが、IRESエレメントをさらに含む、請求項50に記載の発現ベクター。
63. 前記発現ベクターが、第2レポーター遺伝子をさらに含む、請求項50に記載の発現ベクター。
64. 前記第2レポーター遺伝子が、第2転写単位内に含まれる、請求項63に記載の発現ベクター。
65. 前記第2レポーター遺伝子が、ネオマイシン、ヒグロマイシン、ピューロマイシン、ゼオシン、ミコフエノール素、ヒスチジノール、またはメトトレキセ

- ートに対する耐性を付与する、請求項63に記載の発現ベクター。
66. 前記発現ベクターが、ポリアデニル化シグナルをさらに含む、請求項50に記載の発現ベクター。
67. 前記発現ベクターが、組換えアデノウイルスベクターである、請求項50に記載の発現ベクター。
68. 前記発現ベクターが、組換えアデノウイルス (AdV) ベクターである、請求項50に記載の発現ベクター。
69. 前記発現ベクターが、組換えレトロウイルスベクターである、請求項50に記載の発現ベクター。
70. 前記発現ベクターが、配列番号3の核酸配列を含むヒト化GFPレポーター遺伝子を含む、請求項50に記載の発現ベクター。
71. 前記発現ベクターが、増強されたグリーンまたは増強されたブルー蛍光タンパク質を発現する、請求項50に記載の発現ベクター。
72. ヒト化GFP遺伝子を含む、組換え宿主細胞。
73. 前記ヒト化GFP遺伝子が、組換えベクターを用いて前記細胞に導入される、請求項72に記載の組換え宿主細胞。
74. 前記細胞が、前記ヒト化GFP遺伝子が発現し、コード化GFPタンパク質を産生する、請求項73に記載の組換え宿主細胞。
75. 前記細胞が、哺乳動物細胞である、請求項72に記載の組換え宿主細胞。
76. 前記細胞が、ヒト細胞である、請求項72に記載の組換え宿主細胞。
77. 前記細胞が、Vero、HeLa、CHO、COS、F13A、HEK、HepG2、3T3、R1A、MDCK、A549、PC12、BHK、またはMDCK細胞である、請求項72に記載の組換え宿主細胞。
78. 前記細胞が、一次培養細胞である、請求項72に記載の組換え宿主細胞。
79. 前記細胞が、哺乳動物内に位置される、請求項72に記載の組換え宿主細胞。
80. 前記細胞が、配列番号3の核酸配列を含むヒト化GFP遺伝子を含む、請求

- 項72に記載の組換え宿主細胞。
81. 前記細胞が、所望のタンパク質を発現する組換え遺伝子をさらに含む、請求項72に記載の組換え宿主細胞。
82. 適切な事象刺激中に、ヒト化GFP遺伝子を含む発現ベクターを含む、レポーター遺伝子発現キット。
83. 哺乳動物細胞を培養するための方法であって、ヒト化GFP遺伝子を該細胞において発現する工程を含む、方法。
84. 細胞の細胞内の哺乳動物細胞を同定するための方法であって、以下の工程を含む、方法。
- (a) 該細胞において、ヒト化GFP遺伝子が発現する工程；
- (b) GFPを発現しない細胞の集団と該細胞を混合する工程；および
- (c) GFP蛍光強度を同定することによって該細胞を同定する工程。
85. 外因性抗原セグメントを含む哺乳動物細胞を同定する方法であって、以下の工程を含む、方法。
- (a) 外因性抗原セグメントに作動可能に連結されるヒト化GFP遺伝子を含む発現ベクターを、該細胞に導入する工程；および
- (b) GFP蛍光強度を同定することによって、該外因性抗原セグメントを含む細胞を同定する工程。
86. 前記発現ベクターが、GFPをコードする第1コード領域および前記外因性抗原セグメントを含む第2コード領域を含む、請求項85に記載の方法。
87. 前記外因性抗原セグメントが、非翻訳産物をコードする、請求項85に記載の方法。
88. 前記外因性抗原セグメントが、選択されたタンパク質またはペプチドをコードする、請求項85に記載の方法。
89. 前記発現ベクターが、前記選択されたタンパク質またはペプチドに作動可能に連結されたGFPを含む融合タンパク質をコードする第1コード領域を含む、

4

請求項8に記載の方法。

90. 前記融合タンパク質が、細胞下の局在化シグナルを含むペプチドに作用可能に選択された配列を含む、請求項89に記載の方法。

91. 前記融合タンパク質が、細胞下の局在化シグナルを含む選択されたタンパク質およびペプチドに作用可能に選択された配列を含む、請求項90に記載の方法。

92. 前記融合タンパク質が、核内局在化ペプチドに選択された配列を含む、請求項90に記載の方法。

93. 前記融合タンパク質が、ミトコンドリア局在化ペプチドに選択された配列を含む、請求項90に記載の方法。

94. 前記細胞が、異なるスペクトル特性を有するGFPタンパク質を含む発現する、第1および第2ヒト化GFP遺伝子を含む、請求項85に記載の方法。

95. 前記細胞が、ヒト細胞である、請求項85に記載の方法。

96. 前記GFP発光細胞が、蛍光活性化セルソーティングによって決定される、請求項85に記載の方法。

97. 前記細胞が、哺乳動物内に位置する、請求項85に記載の方法。

98. 哺乳動物細胞内の選択されたタンパク質の位置を決定するための方法であって、以下の工程：

(a) 選択されたタンパク質をコードする遺伝子に作用可能に選択されたヒト化GFP遺伝子を含む選択された配列を含む発現ベクターを、細胞内に導入する工程；および

(b) GFP発光の位置を決定することにより細胞内の選択されたタンパク質の位置を決定する工程、を包含する、方法。

99. 前記細胞内の前記選択されたタンパク質の前記位置が、外部刺激に依存する、請求項98に記載の方法。

100. 前記細胞内の前記選択されたタンパク質の前記位置が、細胞周期に依存

する、請求項98に記載の方法。

101. 哺乳動物細胞内の選択された位置にタンパク質を局在化する方法であって、以下の工程：

(a) ヒト化GFP遺伝子およびタンパク質コード遺伝子に作用可能に選択された標的化ペプチドをコードする配列を含む選択された配列を含む発現ベクターを、細胞内に導入する工程；および

(b) GFP発光の位置を決定することにより、細胞内の選択されたタンパク質の位置を決定する工程、を包含する、方法。

102. 哺乳動物細胞内における標的プロモーターを局在化する方法であって、以下の工程：

(a) 標的プロモーターの制御下でヒト化GFP遺伝子を含む発現ベクターを、細胞内に導入する工程；

(b) 標的プロモーターによって選択されたヒト化GFP遺伝子の発現を可能にするのに必要十分な条件下および十分な期間、細胞を維持する工程；および

(c) GFP発光細胞を決定する工程であって、GFP発光細胞の存在が、標的プロモーターを示す、工程、を包含する、方法。

103. 前記標的プロモーターが、標的組織特異的プロモーターである、請求項102に記載の方法。

104. 前記標的プロモーターが、標的組織特異的プロモーターである、請求項102に記載の方法。

105. 前記標的プロモーターが、哺乳動物細胞内における発現について試験される標的遺伝子と天然に会合する、請求項102に記載の方法。

106. 前記細胞が、哺乳動物内に位置する、請求項102に記載の方法。

107. 哺乳動物細胞において、選択されたプロモーターからの転写を制御する物質を施用する方法であって、以下の工程：

(a) 選択されたプロモーターの制御下で、ヒト化GFP遺伝子を含む発現ベク

一を、哺乳動物細胞内に導入する工程；

(b) 標的物質を含むと思われる組成物を、細胞内に施用する工程；および

(c) GFP発光細胞を決定する工程であって、GFP発光細胞の存在が、選択されたプロモーターからの転写を制御する物質の存在を示す、工程、を包含する、方法。

108. 前記物質が、毒素または汚染物質である、請求項107に記載の方法。

109. 哺乳動物において、選択された遺伝子の発現レベルを決定するための方法であって、以下の工程：

(a) 選択された遺伝子に作用可能に選択されたヒト化GFP遺伝子を含む発現ベクターを、哺乳動物の細胞において発現する工程；および

(b) 哺乳動物の細胞においてGFP発光を決定する工程であって、GFP発光のレベルが、選択された遺伝子の発現レベルを示す、工程、を包含する、方法。

110. 哺乳動物の異なる組織における選択された遺伝子の発現を分析するための方法であって、以下の工程：

(a) 天然の遺伝子プロモーターの制御下で選択された遺伝子を含む発現ベクターを、哺乳動物の細胞内に導入する工程であって、該遺伝子は、ヒト化GFP遺伝子に作用可能に選択した、工程；

(b) 該遺伝子の発現を可能にするのに必要十分な条件下および十分な期間、哺乳

動物を維持する工程；および

(c) 哺乳動物の組織の断片を分析する工程であって、所与の組織におけるGFP発光細胞の存在が、該組織における遺伝子発現を示す、工程、を包含する、方法。

111. ヒト化GFP遺伝子を用いる方法であって、哺乳動物宿主細胞においてヒト化GFP遺伝子を発現する工程、および該細胞によって発現されるGFPを回収する工程を包含する、方法。

112. 前記ヒト化GFP遺伝子が、既知の分子量のタンパク質またはペプチドをコードする配列と融合し、そしてここで前記宿主細胞が、GFP融合タンパク質

を発現する、請求項111に記載の方法。

113. 前記遺伝子が、145位のチロシンがフェニルアラニンで置換された配列番号2のアミノ酸配列を有するブルー蛍光タンパク質をコードする、請求項4に記載のヒト化GFP遺伝子。

114. 配列番号2のアミノ酸配列の65位のチロシンをコードするTATが、CATで置換され、そして配列番号2のアミノ酸の145位のチロシンをコードするTATが、TTCで置換されている、請求項1に記載のヒト化GFP遺伝子。

115. 前記遺伝子が、64位のフェニルアラニンがロイシンで置換され、そして65位のセリンがトレオニンで置換された配列番号2のアミノ酸配列を有するグリーン蛍光タンパク質をコードする、請求項1に記載のヒト化GFP遺伝子。

116. 配列番号2のアミノ酸配列の64位のフェニルアラニンとコードするTTCが、CTCで置換され、そして65位のセリンをコードするTTTが、ATCで置換されている、請求項1に記載のヒト化GFP遺伝子。

## 【発明の詳細な説明】

## ヒト化グリーン蛍光タンパク質遺伝子および方法

## 発明の背景

## 1. 発明の分野

本発明は、一般に、レポーター遺伝子の分野に關し、特に改良されたグリーン蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子、構築物、および使用方法を提供する。本明細書中に開示される GFP 遺伝子は、好ましい配列コドンを使用することにより、哺乳動物およびヒト細胞における発現のために適合されたヒト化 GFP 遺伝子である。

## 2. 関連技術の概観

レポーター分子は、遺伝子発現をモニターするために、生物学的な系において頻りに使用される。一般的に使用されるレポーター遺伝子としては、β-ガラクトシダーゼ、セチルルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) およびβ-グルクロニダーゼ (βGS) が挙げられる。しかし、利用可能なレポーター遺伝子は、それらの使用を制限する特定の欠点を有する。頻りに遭遇する問題は、マトリックスの導入が必要とされることである。他の欠点としては、例えば、特定のタンパク質の大きさが挙げられ、これはレポーター-融合タンパク質の発現が困難であり得ることを意味する。

別の有用なストラテジーは、タンパク質を蛍光タグで標識して、インタクトな細胞におけるその後の検出および同定化を可能にすることである。蛍光標識は、免疫蛍光および蛍光アナログ組織化学とともに使用され、ここで、タンパク質の生化学およびトポロジックな、生体組織中へのマイクロインジェクションの後にモニターされる。

蛍光標識は一般に、タンパク質を標識し、そしてそれを有性蛍光光源の反響性標識体に共有結合することにより達成されている。これらの方法において、色素結合の化学構造および位置はしばしば制約することが頻りにあり、そしてタンパク質の任意の位置に標識が必要である。さらなる問題は、標識タンパク質を細胞中へ導入することである。これは、タンパク質を膜透過性を通して導入する

ために、マイクロインジェクション技術または可溶性透過化の方法を含む。

蛍光タグ化タンパク質に対する分子生物学的代替物は、最近の進歩およびグリーン蛍光タンパク質 (GFP) のクローニングにより可能となった。クラゲ *Aequorea victoria* 由来の GFP 10 遺伝子によりコードされるグリーン蛍光タンパク質 (GFP) は、青色光 (395 nm で主要ピーク) を吸収し、そして緑色光 (509 nm で主要ピーク) を発する。238 アミノ酸のタンパク質である (Morin および Hastings, 1971; Ward, 1980; Prasher, 1992)。GFP ヘキサペプチド発色基はアミノ酸 64 において始まり、そして、このヘキサペプチド内のセリン・チロニドヒドロキシ・グリシンの酸化を介して一次アミノ酸配列から誘導される (Shimomura, 1975; Cody, 1992)。

光刺激性 GFP 蛍光は、可逆性であり、そしていかなる標識も、マトリックスも、*A. victoria* 由来のさらなる遺伝子産物も必要としない (Chalfie, 1994)。このことは、有性な遺伝子発現が達成される限り、*A. victoria* 以外の生物組織における GFP の検出を可能にする。従って、GFP の小さな大きさおよび発色の「リアルタイム」検出は、GFP をレポーター遺伝子としての使用のための有望な候補にする。

改造されたスペクトル特性を有する特定の GFP 変異体が、最近報告されている。

例えば、Beck (1994) は、青色蛍光を発し、そして GFP のかわりにヒスチジンを含む変異体を記載した。Beck (1995) は、さらに、*Escherichia coli* のスペクトルにずっとより近いスペクトルを有する Ser35→Thr GFP 変異体を記載した。これは、*Aequorea* GFP の、より長波長のピークの 1 モノマー当たりの吸収係数の 10 倍より大きなモノマー当たりの吸収係数を有する。

しかし、特定の発色にもかわらず (例えば、上記の変異体)、GFP の現在の有用性は、哺乳動物細胞における発現、よくても低レベルにより、なお制限されている。それゆえ、GFP 技術における新たな開発が、このタンパク質の完全な能力が実現される前に、特に、哺乳動物細胞における発現を必要とする適用 (遺伝子治療ストラテジーを含む) において、必要であることは明らかである。

ある。

## 発明の要旨

本発明は、従来技術に固有のこれらおよびその他の欠点を、哺乳動物およびヒト細胞における発現のために適合されたヒト化グリーン蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子を提供することにより、克服しようとする。本発明のヒト化 GFP 遺伝子は、ヒト遺伝子における使用のために好ましいコドンで配列中に組み込むことにより改良される。ヒト化 GFP 発現構築物ならびにヒト化 GFP およびベクターの種々の使用方法もまた提供される。

従って、本発明は、ヒト化グリーン蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子ならびにそのような遺伝子の作成および使用の方法を提供する。本明細書中で使用される用語「ヒト化グリーン蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子」は、少なくとも一つ、そして好ましくは二つ以上を、そして最も好ましくは有意な数のクラゲ GFP のコドンと、ヒト遺伝子においてより頻りに使用される一つ以上のコドンで置換することにより、哺乳動物またはヒト細胞における発現のために適合された遺伝子を意味する。

本発明のヒト化 GFP 遺伝子は好ましくは cDNA であるが、ゲノムコピーは決して除外されない。ヒト化 GFP 遺伝子はまた、好ましくは、*A. victoria* GFP 遺伝子から導出されたヒト化 GFP であるが、他の GFP 遺伝子供給源もまた、除外されない。

特定の発色基において、本発明は、配列番号 2 のアミノ酸配列を有するグリーン蛍光タンパク質をコードするヒト化 GFP 遺伝子を提供する。

他の実施形態において、ヒト化 GFP 遺伝子は、おおむね前記の配列に基づくが、特定の改良を有する GFP 変異体をコードする。特定の例は、55 位のセリンがスレオニンで置換された配列番号 2 のアミノ酸配列を有する GFP をコードするヒト化 GFP 遺伝子である。

さらなる例は、64 位のチロシンがヒスチジンで置換された配列番号 3 のアミノ酸配列を有するグリーン蛍光タンパク質をコードするヒト化 GFP 遺伝子である。

別の例は、64 位と 65 位との間の発色基配列 Ser Tyr Gly Val Glu (配列番号 4) が配列 Ser Gly Tyr Gly Val Leu (配列番号 5) で置換された配列番号 2

のアミノ酸配列を有する GFP をコードするヒト化 GFP 遺伝子である。

ヒト化 GFP 遺伝子の例外的な例もまた、本発明内に含まれる。しかし、アミノ酸配列における一つ以上のアミノ酸置換、またはカルボキシル末端からの約 10 もしくは 15 アミノ酸で短縮された変異体は、蛍光タンパク質の発現に關しては一般に有用であるとは考えられない。それゆえ、コードされる GFP は、最小で約 22 アミノ酸であるべきであり、約 22 アミノ酸長のタンパク質が一般に好ましい。

本発明のヒト化 GFP 遺伝子はまた、少なくとも約 10% のそのコドン置換がヒト化 GFP を含む遺伝子により定規される。すなわち、それらは、ヒト遺伝子において頻りに使用されないコドンのかわりに、ヒト遺伝子において優先的に使用されるコドンを含む。

他の実施形態において、ヒト化 GFP 遺伝子は、少なくとも約 15%、約 20%、約 25%、約 30% または約 35% の、ヒト化 GFP の存在により定規されるコドン置換を有する。

少なくとも約 50% またはそれより多くのコドン置換がヒト化 GFP を含むヒト化 GFP 遺伝子もまた含まれる。

本発明の好ましいヒト化 GFP 遺伝子は、特定の重要な変化 (key change) を含む遺伝子である。例は、クラゲ GFP 配列のコドン位置は 53、55、125、150、178、185、238、239、および 242 に位置する 10 のコドンからの少なくとも 7 つのヒト化 GFP コドンを含む遺伝子である。

好ましくは、ヒト化 GFP 遺伝子は、クラゲ GFP 配列のコドン位置は 53、55、125、150、178、185、238、および 242 に位置する 10 のコドンから、少なくとも 8、少なくとも 9、または 10 のヒト化 GFP コドンを含む。

そのような例外的な例は、ヒト化ロイシンコドン 64、65、または 66 のいずれか一つを、GFP 遺伝子配列のコドン位置は 53、125、178、185、および 238 において含むヒト化 GFP 遺伝子により例示される。さらなる例は、ヒト化ロイシンコドン 64、65、GFP 遺伝子配列のコドン位置 53、150、および 242 において含むヒト化 GFP 遺伝子である。他の例は、ヒト化ロイシンコドン 64、65、GFP 遺伝子配列のコドン位置 20 において含むヒト化 GFP 遺伝子である。

本発明により包含されるヒト化gH遺伝子はまた、配列番号1の野生型クラゲ遺伝子配列と比較して増加した数のGCまたはGTアラニンコードコドンを含む遺伝子を含む。

用語「配列番号1の野生型クラゲ遺伝子配列と比較して増加した数のコドン」は、ヒト化配列が、配列番号1の野生型クラゲ遺伝子配列のコード領域内に存在する同じアミノ酸をコードするコドンと比較して、配列番号2のアミノ酸配列、または本明細書中に記載の改変体もしくはその他の等価物の1つをコードするgHコード領域内の特定のアミノ酸をコードする、増加した数のコドンを含むことを意味する。従って、用語「増加した」が、この関連で使用される場合、コード領域の本増減分への1つ以上のコドンの付加を意味するのではなく、むしろコード領域内の行まじくなくコドンのヒトまたは哺乳動物細胞における無誤のためにより好ましいコドンでの置換を意味することが理解される。

上記の定義に従って、本発明のヒト化gH遺伝子はまた、配列番号1の野生型クラゲ遺伝子配列と比較して、増加した数のTGCシステインコードコドン；増加した数のGCAアスパラギン酸コードコドン；増加した数のGAGグルタミン酸コードコドン；増加した数のTTCフェニルアラニンコードコドン；増加した数のGCGリシンコードコドン；増加した数のGACヒスチジンコードコドン；増加した数のATTイソロイシンコードコドン；増加した数のAGGリタンコードコドン；増加した数のGTCもしくはGTAロイシンコードコドン；増加した数のAGCアスパラギンコードコドン；増加した数のGCCもしくはGTAプロリンコードコドン；増加した数のGCGグルタミンコードコドン；増加した数のGCA、AGAもしくはGCGアルギニンコードコドン；増加した数のAACもしくはTTCセリンコードコドン；増加した数のAGCスレオニンコードコドン；増加した数のGTCもしくはGTAバリンコードコドン；および/または増加した数のGATロシオンコードコドンを含む遺伝子として定義される。

特定の実施形態において、ヒト化gH遺伝子はまた、TGA終止コドンを含む得る。

ヒト化gH遺伝子はまた、配列番号1の野生型クラゲ遺伝子配列と比較して、減少した数の特定のコドンを含むことにより定義される。この関連での「減少

した」もまた、ヒト化配列が、配列番号1の野生型クラゲ遺伝子配列のコード領

域内に存在する同じアミノ酸をコードするコドンと比較して、配列番号2のアミノ酸配列、またはその改変体もしくは等価物をコードするgHコード領域内の特定のアミノ酸をコードする、減少した数のコドンを含むことを意味する。従って、「減少した」が、いかにいかに、コード領域の任意の部分からのコドンの単純な欠失を反映するのではなく、再びクラゲコドンのヒト遺伝子においてより重要に生じるコドンでの置換をいうことが理解される。

従って、本発明のヒト化gH遺伝子はまた、減少した数のGTAアラニンコードコドン；減少した数のGCGリシンコードコドン；減少した数のGTT、CTAもしくはTAAロイシンコードコドン；減少した数のGCAアルギニンコードコドン；減少した数のAAC、TCAもしくはTTCセリンコードコドン；または減少した数のGTTもしくはGTAバリンコードコドンを含む遺伝子として定義される。

必須とされるとは考えられてはいないが、ヒト化gH遺伝子が、ヒト化遺伝子配列の上流に作動可能に配置されたIakコンセンサス配列を含む（すなわち、遺伝子がIakコンセンサス配列の下流に位置される）ことが好ましい。

特定の好ましいヒト化gH遺伝子は、配列番号3の核酸配列を含む。しかし、これは決して限定ではなく、そして本発明のまさに1つの例示的な実施形態である。多くの他のそのようなヒト化gH遺伝子をいかにして作製および使用するかについての詳細な説明は、本明細書中に含まれている。例えば、多数の適切なヒト化gH遺伝子のいずれか1つを作製するにあたり、表2、表3、および表4中の新規が言及される。

本発明の模式においてヒト化された遺伝子はまた、他のタンパク質コード領域配列に作動可能に置換され得る。これは一般に、そのような置換が他の発現産物に、融合タンパク質の産生を生じる。N末端およびC末端の両方の融合タンパク質が置換される。

実質的に任意のタンパク質もしくはペプチドコード領域配列、またはその組み合わせが、融合タンパク質をコードするためにヒト化gH配列に融合される。これは、恒常的ペプチド、治療的タンパク質、阻害剤死後のためのタンパク質、

1つ以上の恒常的ペプチドが付与されたタンパク質、タンパク質サブユニットなどをコードする核酸配列を含む。

阻害剤ペクチンおよびプラスミドは、本発明の別の重要な局面を形成する。そのようなペクチンにおいて、ヒト化gH遺伝子は、プロモーター（一般に、哺乳動物またはヒト細胞において作動可能であるプロモーター）の転写制御下に位置される。「転写制御下に位置される」は、ヒト化gH配列が、プロモーターの下流にそして転写制御下に位置され、その結果、そのプロモーターが、哺乳動物またはヒト宿主細胞におけるコードされるgHタンパク質の発現を、ペクチンのそのような細胞中への導入に応じて、指向させることを意味する。

従って、本発明の阻害剤ペクチンは一般に、プロモーターの下流に作動可能に配置されたヒト化gHペクチン遺伝子を含む。ここで、プロモーターは、哺乳動物またはヒト細胞におけるヒト化gH遺伝子の発現を指向させる。好ましくは、プロモーターは、細胞におけるgHの発現産物にグリーン蛍光を放出することによるgHの検出を可能にするに十分な量のgHの発現を指向させる。従って、そのようなプロモーターは、哺乳動物およびヒト細胞において「作動可能」である。

本発明による阻害剤ペクチンおよびプラスミドは、1つ以上の誘発性プロモーター（例えば、転写を促進することにおいて一般に活性である、ウイルスプロモーターまたは哺乳動物遺伝子由来のプロモーター）を含む得る。誘発性ウイルスプロモーターの例としては、CMV、TK、SV40、およびgHプロモーターが挙げられる。この中で、CMVプロモーターが現在好ましい例である。誘発性哺乳動物プロモーターの例としては、βアクトチンプロモーターにより誘発されるような遺伝子のハウスキープ遺伝子プロモーターが挙げられる。

阻害剤プロモーターおよび/または阻害剤エレメントもまた、本発明の阻害剤ペクチンとの使用のために意図される。適切な阻害剤プロモーターの例としては、例えば、チトクロムP450遺伝子、色シクロタンパク質遺伝子、メタロチオネイン遺伝子、ホルモン感受性遺伝子（例えば、エストロゲン遺伝子プロモーター）などの遺伝子由来のプロモーターが挙げられる。電離放射線への曝露に応じて誘

性化されるプロモーター（例えば、*os*、*isa*、および*egr-1*）もまた意図される。チトラサイクリンに感受性であるtet<sup>+</sup>プロモーターが現在好ましい例である。

組織特異的プロモーターおよび/または阻害剤エレメントは、特定の実施形態において有用である。本発明の阻害剤ペクチンと使用されるそのようなプロモ

ーの例としては、肝臓阻害剤（*α*）タンパク質遺伝子（肝臓上皮に特異的）；インスリン遺伝子（膵臓細胞に特異的）；トランスフェリン（*transferrin*）；α<sub>1</sub>-アンチトリプシン、プラスミノーゲン活性化因子（*plasminogen activator*）；アポリポrotein BおよびA<sub>1</sub>（*apoB*）（肝臓細胞に特異的）；ミエリン基本タンパク質（*MBP*）遺伝子（中枢神経細胞に特異的）；グリッパ阻害剤タンパク質（*GP*）遺伝子（神経細胞に特異的）；*OPN*（骨への骨形成に特異的）；ならびに神経細胞に特異的である神経特異的エノラーゼ（*NEF*）プロモーターが挙げられる。

阻害剤ペクチンおよびプラスミドの構築および使用は、当業者に周知である。従って、実質的に任意の哺乳動物細胞阻害剤ペクチンが、本明細書に開示されるヒト化gH遺伝子に関連して使用される。

好ましいペクチンおよびプラスミドは、少なくとも1つのマルチクローニング部位を有して構築される。特定の実施形態において、阻害剤ペクチンは、プロモーターとヒト化gH遺伝子配列との間に作動可能に配置されたマルチクローニング部位を含む。そのようなペクチンは、他の実施形態におけるそれらの使用に加えて、第2のタンパク質コード領域セグメントを、それがヒト化gH配列と連続的かつインフレームであるように、マルチクローニング部位中にクローニングすることにより、N末端融合タンパク質を作製するために使用される。

他の実施形態において、阻害剤ペクチンは、阻害剤ヒト化gH遺伝子配列のF側に作動可能に配置されたマルチクローニング部位を含む得る。これらのペクチンは、それらの使用に加えて、第2のタンパク質コード領域セグメントを、それがヒト化gH配列と連続的かつインフレームであるように、マルチクローニング部位中にクローニングすることにより、C末端融合タンパク質を作製することにお

いて有用である。

その中に第2のタンパク質または配列コード領域セグメントもまた存在するベクターおよびプラスミドはまた、もちろん、複製セグメントそれ自体の性質にかかわらず、本発明により包含される。

第2のレポーター遺伝子が、本発明の発現ベクター内に含まれる。第2のレポーター遺伝子は、第2の転写単位内に含まれる。適切な第2のレポーター遺伝子としては、ネオマイシン、ハイグロマイシン、ピューロマイシン、ゼオシン (zeo<sup>+</sup>)、ミコフェノール酸、ヒスチジン耐性およびメトトレキサートのような薬剤に対する耐性を与える遺伝子が挙げられる。

発現ベクターはまた、IISエレメント、ポリAデニル化シグナル、スプライスドナー/スプライスアクセプターシグナルなどのような他の複製配列を含み得る。

適切な発現ベクターの特定の例は、組換えアデノウイルス、組換えアデノ随伴ウイルス (AAV)、または組換えレトロウイルス等を使用する発現に適合されたベクターである。とりわけ、ワクシニアウイルス、単純ヘルペスウイルス、サイトメガロウイルス、および欠陥型痘苗ウイルスもまた使用される。

特定の実施態様において、発現ベクターまたはプラスミドは、配列番号3の複製配列を有するヒト化β<sub>2</sub>レポーター遺伝子を含み得る。

レポーター遺伝子発現キットもまた提供される。このキットは一般に、適切な容積手段中に、ヒト化β<sub>2</sub>遺伝子を含む少なくとも1つの発現ベクターまたはプラスミドを含む。ベクターまたはプラスミドは一般に、哺乳動物またはヒト細胞における発現後のグリーン蛍光によるβ<sub>2</sub>の発現を可能にするに十分な量のβ<sub>2</sub>を発現し得るベクターまたはプラスミドである。

組換え宿主細胞は、本発明の例の局面を形成する。そのような宿主細胞は一般に、少なくとも1コピーのヒト化β<sub>2</sub>遺伝子を含む。発現目的のために好ましい細胞は、哺乳動物およびヒト細胞である。しかし、他の細胞が本発明の局面型から除外されないことが理解される。従って、細菌細胞、酵母細胞、真菌細胞、昆虫細胞、植物細胞、および植物細胞のような細胞もまた可能であるが、その上

ず、少なくとも1コピーのヒト化β<sub>2</sub>遺伝子またはベクターを含む全ての細胞が挙げられる。

特定の実施態様において、配列番号3の複製配列を含むヒト化β<sub>2</sub>遺伝子を含む組換え宿主細胞が提供される。

ヒト化β<sub>2</sub>遺伝子を使用する多数の方法が、本発明により提供される。哺乳動物またはヒト細胞を、細胞内で少なくとも1つのヒト化β<sub>2</sub>遺伝子を発現することにより原液またはタグ化する方法は、各方法の中心である。ヒト化β<sub>2</sub>遺伝子は、好ましくは、β<sub>2</sub>蛍光を検出することによる細胞内のβ<sub>2</sub>の存在を抽出を可能にするに十分な量のβ<sub>2</sub>を産生するはずである。

細胞の集団内で哺乳動物またはヒト細胞を同定する方法もまた提供される。このような方法はまず、一般に、蛍光によるβ<sub>2</sub>検出を可能にするに十分な量のβ<sub>2</sub>を産生するために有効な形式で、細胞内で少なくとも1つのヒト化β<sub>2</sub>遺伝子を発現する工程を包含する。次いで、細胞はβ<sub>2</sub>を発現しない細胞の集団と混合されるか、または自然に混合させ、続いてこの細胞が、β<sub>2</sub>蛍光細胞を同定する手段により同定される。

本明細書中で使用される用語「β<sub>2</sub>発光細胞」は、細胞中のβ<sub>2</sub>からのグリーン蛍光を抽出することによる細胞の結果的な抽出を可能にするに十分な量のβ<sub>2</sub>の生成を生じるために有効な形式でヒト化β<sub>2</sub>遺伝子を発現する細胞を意味する。

本発明はさらに、外国性限セグメントを含む哺乳動物またはヒト細胞を同定するための方法を提供する。この方法はまず、一般に、外国性限セグメントに作動可能に連結されたヒト化β<sub>2</sub>遺伝子を含む発現ベクターを哺乳動物またはヒト細胞に導入する工程を包含する。次いで、細胞は、グリーン蛍光によるβ<sub>2</sub>検出を可能にするに十分な量のβ<sub>2</sub>を産生するために、好ましくは、ヒト化β<sub>2</sub>遺伝子の発現を可能にするに有効な条件下および期間で培養される。引き続いて、外国性限セグメントを含む細胞を結果的に同定することは、β<sub>2</sub>蛍光細胞を同定することにより達成される。

これらの方法は、本細説産物（たとえば、アンチセンス核酸分子、リボゾーム

うな細胞は発現目的のためには好ましくない。

特定の実施態様において、組換え宿主細胞は好ましくは、細胞がβ<sub>2</sub>を、最も好ましくはβ<sub>2</sub>のその蛍光による検出を可能にするに十分な量で、発現する、または発現するように刺激されることを可能にするに有効な形式で、ヒト化β<sub>2</sub>遺伝子を含み込む。従って、組換え宿主細胞に好ましくは、組換えベクターにより細胞中に導入されたヒト化β<sub>2</sub>遺伝子を含む。

特定の実施態様において、組換え宿主細胞は、ヒト化β<sub>2</sub>遺伝子を発現して、コードされるβ<sub>2</sub>タンパク質を、好ましくはβ<sub>2</sub>のその蛍光による検出を可能にする

に十分な量で、産生する。約20コピーほどのヒト化β<sub>2</sub>遺伝子を含む細胞が、しばしば、β<sub>2</sub>のそのグリーン蛍光による検出を可能にするに十分な量で、β<sub>2</sub>タンパク質を発現することが望まれる。特定の実施態様において、約10コピー、約5コピー、またはたった約1もしくは2コピーほどのヒト化β<sub>2</sub>遺伝子を含む細胞もまた、特にヒト化β<sub>2</sub>遺伝子が安定体遺伝子である場合、所望される発現基準を満たし得る。他の実施態様において、組換え宿主細胞は、約10時間の培養期、そして好ましくは約5時間以内、そして最も好ましくは約6時間以内またはより短い時間以内で検出可能なβ<sub>2</sub>タンパク質を産生するために、ヒト化β<sub>2</sub>遺伝子を発現し得る。

適切な組換え宿主細胞の例としては、Vero細胞、HeLa細胞、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞株の細胞、COS細胞 (例えば、COS-7)、ならびにB12、BHK、BspG、3T3、B12、MDCK、A549、PC12、E2E、および293細胞が挙げられる。

哺乳動物から細胞を取り出し、そして細胞を同定された発現装置した後に樹立された細胞培養の細胞もまた、本発明の範囲内に含まれる。これらの細胞は、人の手により加工され、そしてそれがもともと回収された同じ宿主動物に戻される。ヒト化β<sub>2</sub>遺伝子を含むそのような細胞は、その位置にかかわらず、本発明の範囲内に入る。

当然、組換え細胞はまた、遺伝子治療により提供されたような、動物またはヒト被験体の身体内に位置する細胞を含む。これらの細胞としては、遺伝子が提供された形式 (例えば、トランスフェクション、感染などによる) にかかわら

ず、または他の形式でコードする外国性限セグメントを同定するために、および細胞産物 (例えば、選択されるタンパク質またはペプチド) をコードする外国性限セグメントを同定するためにまた適切である。

特定のこのような実施態様において、このような方法での使用のための発現ベクターは、β<sub>2</sub>をコードするヒト化β<sub>2</sub>遺伝子として規定される第1のコード領域を含み、そしてまた外国性限セグメントを含む第2のコード領域を含む。これらのベクターは、一般に、少なくとも2つの転写ユニットまたは翻訳ユニットを含むベクターとして公知である。2つの転写ユニットは、それらのそれぞれの下流遺伝子の発現を案内する3つのプロモーター-ターミナルを含む。

外国性限セグメントを含む哺乳動物またはヒト細胞を同定する方法はまた、

選択されるタンパク質またはペプチドに作動可能に連結されたβ<sub>2</sub>を含む融合タンパク質をコードする第1のコード領域を含む発現ベクターを用いる使用に適切である。このベクターは、選択されるタンパク質またはペプチドに作動可能に連結されたβ<sub>2</sub>を含む融合タンパク質を発現する。本発明のこれらの局面は、一般に、必ずしも排他的ではないが、細胞産物をコードする外国性限セグメントの抽出を排除する。

このような形式で発現される融合タンパク質は、細胞下の sub-cellular 局在化シグナル (例えば、膜結合的ペプチドまたはミトコンドリア膜化ペプチド) を含むペプチドに作動可能に連結されたβ<sub>2</sub>を含む。融合タンパク質はまた、細胞下の局在化シグナルを含む選択されるタンパク質およびペプチドの両方に作動可能に連結されたβ<sub>2</sub>を含む。

このような同定方法は、以下に記載されるような考慮において種々の目的でインビトロで実施される。これらの同定方法はまた、インビボで実施され得、ここで細胞は、哺乳動物またはヒト被験体内に位置される。

2つ以上のヒト化β<sub>2</sub>遺伝子 (各々が異なるスペクトル特性を有するβ<sub>2</sub>タンパク質を発現する) が、上記の形式で細胞内で検出される。1つ、2つ、またはそれ以上のいずれかのヒト化β<sub>2</sub>遺伝子が発現するβ<sub>2</sub>蛍光細胞は、種々の方法により同定される。この方法は、膜結合的および蛍光活性化セルソーティング (FACS)

(5)を含む。

本発明の方法のさらなる例は、哺乳動物細胞またはヒト細胞内での選択されるタンパク質の位置を決定するための方法である。これらの方法は、一般に、選択されるタンパク質をコードする遺伝子に作動可能に連結されたヒト化GFP遺伝子を含む変換を含む変換ベクターを細胞に導入する工程を包含する。このベクターは、一般に、選択されるタンパク質に作動可能に連結されたGFPを含む融合タンパク質を発現する。ここで、この融合タンパク質は、GFPのグリーン蛍光を放出することによる細胞の検出を可能にするために十分な量で産生される。次いで、GFPからのグリーン蛍光の位置を測定することにより、細胞内の選択されるタンパク質の位置が特定される。

これらの方法は、細胞内での選択されるタンパク質の位置を決定するために適

切であり、ここで、この位置は、外部刺激（例えば、熱、低濃度、塩、またはホルモン、サイトカイン、神経伝達物質などのような種々のアゴニストの存在）に依存すると知られるかまたは考えられる。これらの方法はまた、細胞内の選択されるタンパク質の位置を決定するために適切であり、ここで、この位置は、細胞周期における変化の間、細胞の老化の間、およびアポトーシスなどの間に存在するような内部シグナルに依存すると知られるかまたは考えられる。

本発明の方法のさらなる例は、タンパク質を哺乳動物またはヒト細胞内の選択される位置へ局在化するための方法である。これらの方法は、一般に、ヒト化GFP遺伝子の調節配列エレメントに作動可能に連結されそしてそれに連関する標的化ペプチド（これはまた、タンパク質をコードする調節配列エレメントに作動可能に連結されそしてそれに連関する）をコードする調節配列エレメントを含む変換を含む変換ベクターを細胞に導入する工程を包含する。このようなベクターは、GFPおよびタンパク質に作動可能に連結された標的化ペプチドを含む融合タンパク質を発現する。ここで、この融合タンパク質は、GFP蛍光を放出することによって細胞の検出を可能にするために十分な量で細胞内で産生される。次いで、タンパク質は、細胞内の選択される位置に標的化され、そしてその位置が、グリーン蛍光の位置を放出することにより確認される。

される。次いで、細胞が、所定のプロモーターからの転写を抑制し得ることが知られるかまたは疑わしい物質を含むことが疑われる組成物に曝される。次いで、細胞は、活性プロモーターが、GFP由来グリーン蛍光を放出することによって細胞検出を可能にするために十分な量でGFP融合タンパク質を産生することを通常可能にする期間、培養または維持される。次いで、引き続くGFP蛍光細胞の測定は、所定のプロモーターからの転写を抑制する物質の元の存在を示す。

これらの方法はまた、インビトロおよびインビボでの使用に適切である。インビトロでの使用は、毒薬および汚染物質のような物質が、ヒト化GFP遺伝子/標的タンパク質での適切なプロモーターを使用することにより検出されることを可能にする。

遺伝子治療の部分として、局在される哺乳動物またはヒト細胞内の遺伝子発現レベルを決定することがしばしば必要とされる。本発明はまた、このような発現レベルを決定するための方法を提供する。これらの方法は、一般に、選択される遺伝子に作動可能に連結されたヒト化GFP遺伝子を含む変換ベクターを動物の細胞内で発現させる工程を包含する。変換ベクターは、好ましくは、GFP融合タンパク質を発現するベクター、またはヒト化GFP遺伝子および局在されるタンパク質遺伝子がそれぞれ同一または異なるプロモーターを使用するベクターのいずれかである。プロモーターは、好ましくは、インビトロでの検出を可能にするために十分なGFP発現を生じることが示されている。次いで、動物の細胞内のGFP蛍光が決定され、ここで、GFP蛍光のレベルは動物内における選択される遺伝子の発現レベルを示す。

これらの方法は、哺乳動物またはヒト細胞の異なる組織内の選択される遺伝子の発現を分析するための方法を提供するように適合される。このような方法は、一般に、特定の遺伝子プロモーターの制御下で選択される遺伝子（ここで、この遺伝子は、ヒト化GFP遺伝子に作動可能に連結された）を含む変換ベクターを哺乳動物の細胞内に導入する工程を包含する。ベクターは、好ましくは、GFPに作動可能に連結されたコード遺伝子産物を含む融合タンパク質を発現し、この融合タンパク質は、GFPのグリーン蛍光を放出することによる細胞検出を可能に

本発明に関連する方法のさらなる例は、哺乳動物またはヒト細胞内の細胞プロモーターを試験するための方法である。

これらの方法は、一般に、候補プロモーターの制御下でヒト化GFP遺伝子を含む変換ベクターを細胞に導入する工程および候補プロモーターによるヒト化GFP遺伝子の発現を可能にするために有効な条件下および十分な期間で細胞を維持する工程を包含する。「有効な条件」および「十分な期間」は、既知の操作性なプロモーターを使用する場合に、グリーン蛍光によるGFP検出を可能にするために十分な量で産生されるGFPを通常生じるそれらの条件および時間として定義される。

適切な条件下で細胞を維持した後、ついで、任意のGFP蛍光細胞が測定される。ここで、GFP蛍光細胞の存在は、測定される細胞内での発現結果物における活性プロモーターを示す。

これらの方法は、候補細胞特異的プロモーターを分析するため（ここで、このプロモーターは、哺乳動物またはヒト細胞の細胞内で試験される）；および候補細胞特異的プロモーターを分析するため（ここで、このプロモーターは、一般に、条件の制御下で試験される）に適切である。本明細書中で使用される用語「細胞特異的プロモーター」は、特定の組織中で特異的に遺伝子発現を指向するプロモーターおよび所定の組織中で遺伝子発現を低発的に指向するプロモーター（これはまた、「組織特異的」プロモーターと名付けられる）をいうために使用される。候補プロモーターはまた、哺乳動物またはヒト細胞内での発現のために試験される候補遺伝子と天然に適合するプロモーターであり得る。

これらの方法はさらに、インビトロおよびインビボでプロモーターを分析するために適切である。ここで、候補の場合、細胞は、哺乳動物またはヒト細胞体内に位置される。

プロモーターの文脈において、ヒト化GFPを使用するための方法のさらなる例は、哺乳動物またはヒト細胞内の選択されるプロモーターからの転写を抑制する物質を検出するそれらの方法である。さらに、一般に、所定のプロモーターの制御下でヒト化GFP遺伝子を含む変換ベクターが、哺乳動物またはヒト細胞内に導入

するために十分な量で産生される。遺伝子の発現を可能にするために有効な条件下および十分な期間で哺乳動物を維持した後、次いで、哺乳動物の組織の細胞が、GFP蛍光細胞を検出するために分析され、ここで、所定の組織内のGFP蛍光細胞の存在は、組織内の遺伝子発現を示す。

ヒト化GFP遺伝子が使用されるさらなる例は、GFP自身の組成成分である。ヒト化GFP遺伝子を使用することのこのような方法は、特に、哺乳動物またはヒト細胞内でヒト化GFP遺伝子を発現する工程およびその細胞により発現されるGFPを回収する工程を包含する。

これらの方法は、以下の工程を包含するように、より完全に記載される：

- (a) ヒト化GFP遺伝子が哺乳動物またはヒト細胞内で操作可能なプロモーターの制御下で位置される、変換ベクターを調製する工程；
- (b) 変換ベクターを哺乳動物またはヒト細胞内に導入する工程；
- (c) コード化グリーン蛍光タンパク質（GFP）の発現を可能にするために有効な条件下および十分な期間で宿主細胞を培養する工程；および
- (d) その発現されたGFPを回収する工程、および、好ましくは、他の細胞性タンパク質の十分な量を有さないGFPを精製する工程。

このような方法の適合化は、ヒト化GFP遺伝子が、公知の分子量のタンパク質またはペプチドをコードする調節配列と融合されることを含む。従って、宿主細胞による発現は、蛍光分子マーカーとして使用され得るGFP融合タンパク質を生じる。このような蛍光分子マーカーの範囲は、分子量決定キットを作用するためにこのように産生される。

#### 図面の簡易な説明

以下の図面は、本発明の明細書の部分を形成し、そして本発明の特定の局面をさらに示すために含まれる。本発明は、本明細書中に提示される特定の実施形態の詳細な説明と組み合わせた一つ以上のこれらの図面を参照してより良好に理解される。

図1、gfp10 cDNAのヌクレオチド配列および限定アミノ酸配列、各コメンの上下は、アミノ酸の一字表記である。gfp10配列内に導入された変異は、下のgfp10

8

の複製スケレオチドに示される。複製は、*gfp* cDNAを含むために使用されるオリゴヌクレオチドを相互にプライムする塩基配列に下線を引く。オリゴヌクレオチドの複製される対を組み立てるために使用される複製酵素の部位は、太字で示される。Ser55His変異（より高い蛍光強度を産生する）およびTyr5His変異（ブルー蛍光を産生する）を産生するために変異されるコドンには、太字で示される。図1において、クラゲ*gfp10*スケレオチド配列に、配列番号1である、指定アミノ酸配列は、配列番号2である。配列番号2において、65位のAsaは、SerまたはThrであり得る；そして66位のIaaは、TyrまたはHisであり得る。図1の下側の複製スケレオチドに示される例示的なヒト化*gfp*配列は、配列番号3である。配列番号3において、135、136、および138位のヌクレオチドが、上記のように、SerまたはThrのいずれか；およびTyrまたはHisのいずれかをコードするために変化される。

図2は、AAVおよびレポータープラスミドの感染地図、rAAVプラスミドの構築物について画定するそれらの制限部位のみを示した、可能なエレメントおよびレポーター遺伝子カセットのサイズは、塩基対で示される。遺伝子およびレポーター

エレメントの系統学は、以下のようである：135-34 (BacLamb135, 1999) 由来のpB13-34 II-フラグメント (135bp-オリゴ (60)、オリゴ (40)、180bp) である；P135は、GFPの即時/遅延のプロモーター/エンハンサーである；5S/3Aは、SV40複製ウィルスタンパク質遺伝子135/135スプライズドナーおよび受容体シグナルである；*gfp*は、pTetG-IFN内の*vectoria*グリーン蛍光タンパク質cDNA、またはpTetG-IFN内の化学合成されたヒト化WT *gfp*cDNA、またはpTetG-IFN内のTetG *gfp*、またはpTetG-IFN内のTetG *gfp*である；*gfp*は、SV40ゲノム由来のSV40ポリアデニル化シグナルである；*P135*は、ポリオマウイルス変異体P135由来のエンハンサーの複製反応である；*P135*は、SV40のプロモーターである；*neor*は、7.6由来のネオマイシン耐性遺伝子である；*p135*は、pAc/PV (P135) 由来のウシ成虫ホルモンポリアデニル化シグナルである；*135*は、pSIC-1由来の1型ポリオウイルスの内包ポリオーム侵入部位である (P135、138)。

図2は、pTet-IFN活性ベクターの構築。

図7。ヒト化*gfp*のブルーHis変異体の蛍光。293細胞は、pTetG-IFNおよびpTetG-IFNで同時トランスフェクトされ、そしてトランスフェクションの4日後に、Nikon Filter (488 nm) を使用して蛍光顕微鏡で撮影された。

図8。蛍光顕微鏡で見られる感染細胞の単一のブローク。ブロークは、感染の即時両側に撮影された。

図9A、図9B、図9C、および図9D。rAAV-GFPで感染されたモルモットEP6のセグメントにおけるGFP蛍光。図9A、図9Bで見られる領域近くの感染した細胞からの複製の数千倍対比画像 (contrast image)。示される複製の上端近くの暗く着色した細胞の層は、わずかに傾斜した切片中のEP6層である。光受容体細胞層および他の神経細胞層は、その下に隠れる。図9C、共焦点顕微鏡による複製長の最近および遠光発光光学的下で見られる注入部位近くのrAAV-GFP複製された眼由来の複製。図9D、注入部位から遠位の部位での図9Bと同じ域からの複製の蛍光。図9A、図9B、図9C、および図9Dと同じ動物の本注入の域からの複製の蛍光。

図10。pCEREFLAVENTRプラスミド、GFPは、本発明のヒト化GFPを示す。他の潜在的エレメントおよび制限部位が示される。

#### 好ましい実施形態のさらなる説明

クラゲグリーン蛍光タンパク質 (GFP) は、レポーター遺伝子としての使用のための有望な候補として提唱されている。しかし、*gfp* 遺伝子の顕著な欠点は、それが哺乳動物細胞系で十分な発現を生じないことである。実際に、組換えアデノウイルス (AAV) によりヒト細胞に迅速に送達されたクラゲGFPレポーター遺伝子を発現するような本発明者の最初の試みは、失敗した。

本発明者は、GFPの発現の重要な理由は、ヒト細胞環境におけるcDNAの正しい翻訳効率であると仮定した。これは、クラゲにおいて使用されるものと異なる受容体 (R) のセットにより特徴付けられる。発現の問題を解決することにおいて、それ故、本発明は、哺乳動物細胞 (特に、ヒト細胞の細胞) における高レベルの発現に適合されたクラゲグリーン蛍光タンパク質 (*gfp* cDNA) の合成バージョンを提供する。本発明に従って、塩基置換が、*gfp* cDNA配列内でのコドン

図3。pTetG-IFNの組換えプラスミドでトランスフェクトされた293細胞のFACS分析。293細胞 (6ウェルディッシュ) が、従来のカルシウムリン法トランスフェクションプロトコルを使用して、 $1.5 \times 10^6$  の細胞 (これは、異なる比の *gfp* 含有プラスミドおよび感染細胞送達されたサンキャリヤプラスミドからなる) でトランスフェクトされた。細胞は、トランスフェクションの6時間後に回収され、そしてフローサイトメーターで分析された。陽性として記述された細胞は、トランスフェクトされた *gfp* 含有プラスミドの量の調整としてグラフ上にプロットされた。透明のバーは、pTetG-IFNに相対し、影付きのバーは、pTetG-IFNに相対し、そして黒いバーは、pTetG-IFNに相対する。

図4Aおよび図4B。293細胞内でのrAAV-GFPの発現。293細胞は、CaCl<sub>2</sub> 溶液 rAAV-GFPに100の  $10^6$  L で感染された。感染後24時間の細胞が、Cytochrome C (Cytochrome C) (488 nm) を使用して、蛍光顕微鏡で撮影された。図4A、感染後24時間の細胞。明視野 (left field)；図4B、同じ視野、追加蛍光 (left field)。

図5A、図5B、図5C、および図5D。rAAV-GFPでプロウイルスを含むGFP-耐性コロニーの蛍光。293細胞は、CaCl<sub>2</sub> 溶液 rAAV-GFPに100の  $10^6$  L で感染された。感染後24時間の細胞は、分析され、そして低い (10%未満) コンフルエンスでプレートされた。18時間後、図5Aは、 $10^6$  cells/plate で感染された細胞は、4日後に交換され、そしてGFP耐性コロニーは、選択的に増殖された。図5Aおよび図5B、感染後24時間の下のGFP耐性コロニー。明視野；図5Cおよび図5D、図5Aおよび図5Bと同じ視野、追加蛍光。

図6A、図6B、図6C、および図6D。rAAV-GFP、rAAV-GFP、またはrAAV-GFPで感染した細胞のFACSヒストグラムプロット。図6A、rAAV-GFPで感染した細胞；図6B、rAAV-GFP；および図6C、rAAV-GFP。各場合について、20,000の細胞が分析された。各細胞タイプについて、条件と記録された細胞の表示されていない領域は、未感染293細胞：0.06%；GFP：0.05%；GFP：0.67%。GFP：0.67%であった。

使用頻度を向上させるために、*gfp* cDNAにおいて修飾され、それにより哺乳動物細胞系での発現により適応となる。哺乳動物およびヒト細胞における遺伝子の迅速および発現のための、複製プラスミドならびに一連の複製プラスミドおよびGFPベクターもまた、提供される。

特定の好ましい局面において、本発明は、哺乳動物およびヒト細胞における両レベル発現に適合された*vectoria*グリーン蛍光タンパク質cDNAの合成バージョンに関する。この複製的な複製物において、計25塩基の置換が、*gfp* cDNA配列内でのコドン使用頻度を向上させ、そして哺乳動物細胞系における発現を劇的に改善するために、68のコドンにおいて作製された。

蛍光強度については、本発明者は、GFPレポーター遺伝子系感受性を、ヒト化複製物について評価した。そして図2のヒト化複製物について少なくとも45倍増加させた。ヒト化複製物のFACS分析において、1つの複製物が、少なくとも10倍、元のクラゲ遺伝子より感受性であって、そして、他の複製物は、10倍、元のクラゲ遺伝子より感受性であった。ヒト化GFPが、GFP耐性細胞系においてrAAVプロウイルスの*gfp*-neoカセットの一部として定量的に取り込まれた場合、細胞のかなりの部分が、複製的に抽出可能なGFPを発現する。

以前に公開されたデータによると、rAAVは重なり返し反復として、1~10の範囲の断片当たりのゲノムコピー数を取り込む (Chen et al., 1999; Laughlin et al., 1999; Laughlin et al., 1999; Samuel et al., 1999)。したがって、強力プロモーターの制御下で、断片当たり1~10コピーのヒト化GFPの範囲は、本明細書に記載されるように、抽出される。特定のGFP変異体については、この数は同じくらい低くあり得る。

ヒト化GFPを有する使用のための複製ベクターの1つの例として、rAAVベクターが提供される。ベクターのpTetG-IFN (使用者に優しい) シリーズの設計 (図2A) は、rAAVベクターの構築物において、便宜と柔軟性を提供する。5Sbpの最大クローニング容量を使用するために、全レポーター遺伝子カセットがpTetG-IFNでの調化により欠損させられ、したがって、AAV 293の複製およびパッケージングのために必要な配列のみであるAAVの2つの末端反復のみが残る。

pTegs-IPシリーズは、2つのレポーター遺伝子セットであるGFPおよびlacZ（それぞれ自身のプロモーターおよびサブアデニル化シグナルを有する）を含む。これらの2つの転写単位は、独立に大規模な（GFPに対してはXbaI-HindIII消化、そしてlacZに対してはSalI消化）、これは目的の遺伝子のためのクローニングスペースを増大させる。このように使用される場合においてさらに、このベクターは、1 kbまでの別の転写単位を適合させる。

さらに、与えられた細胞型または組織において特定のプロモーターの効率を測定した。ベクターはXbaIおよびHindIIIで消化した後、gfp遺伝子のCIVプロモーター上にこれを置換することにより試験される。pTegs-IPベクターの設計はまた、LacZ要素の使用により、レポーターgfp遺伝子および同じプロモーター由来の目的の遺伝子レポーターの発現を可能にする。

さらに、本発明者らは、LacZ要素の制御下で、ヒト化GFPレポーター遺伝子を有するMycタグベクターの構築物を記述する。構築物A4を感染させた細胞は、代表的なGFPおよび特定の組織の発光を示した。GFPの発現は、迅速で特定の組織の遺伝子発現を、他のプラークと区別することと可能にする。

ヒト化GFPはまた、他のウイルスおよび非ウイルスベクターおよび発現系に取り込まれる。本発明のヒト化遺伝子およびベクターを使用して、哺乳動物およびヒト細胞におけるgfp遺伝子発現の効率的な導入および発現が可能である。

これは、本明細書に記載されるように、モルモット眼の神経感覚細胞内のインビトロの遺伝子発現により、説明される。ヒト化gfp遺伝子は、蛍光染色細胞選択（FACS）による細胞選択、およびヒト遺伝子発現におけるような多くの使用を有する。

実際、本明細書に記載された系は、哺乳動物細胞の組織において、組織FACS選別による抽出を可能にするのに十分な感受性レベルの効率的な遺伝子の導入および発現を可能にすることが示される。GFPのような基質で置換された細胞の選択、あるいはβガラクトシダーゼのような酵素活性の可視化のための細胞の発現は、このように、容易される。MycおよびlacZ、同様に、非常に広範な宿主細胞を有するため、記載されたベクターは、ヒト遺伝子発現を含む、多数の

、実質的に切断されたgfp遺伝子は、特に有用であることが示唆されない。しかし、このようなタンパク質のための1つの使用は、それに続く抗体産生のための、哺乳動物細胞における高レベルのGFP産生であり得る。

## 2. グリーン蛍光タンパク質

AequoreaGFPは、235アミノ酸残基のタンパク質である。その最大の蛍光ピークは、475nmでより小さなピークを有する355nmである。これらのピークの増幅（すなわち、蛍光係数）は、それぞれ1.1〜30および7〜15nm<sup>2</sup>cm<sup>-1</sup>と見積もられている（Morrisら、1974）。355nmでの吸収は、505nmにおいて最大発光を生じる。量子収率または光子の再発光の確率は、一旦分子が励起されると、0.72〜0.85（Bairdら1974）であり、そして励起状態の持続時間は1.25nsである（Pereraら、1988）。

GFPは、非常に安定なタンパク質であるため、それらのスペクトル特性が変性条件下で比較的安定である。報告されたタンパク質はまた、数時間にわたって、ほとんどのプロテアーゼに耐性がある（Baird、1981、1982; BairdおよびRakman、1982; CutlerおよびBaird、1993）。しかし、変性の際、GFPがその発光を失う。

（Bairdら、1990）。中性水性緩衝液において、発光を半減させる温度は、AequoreaGFP（Baird、1981）の場合、73°Cであると見出されている。Aequorea GFPは、βグアニジン-βC（pHで2.5）で、pHでの熱変性またはpHでのアルカリ化の処理を使用すれば、発光が全て失われて変性されるが、GFPを還元して発光を回復させることが可能である（BairdおよびRakman、1982）。この還元には、チオールが必要であるようである（SimpsonおよびBaird、1993）。

Serfs、Tyrell、およびGillの酸化ならびにチロシンの1,7-脱アセチル化により形成される、GFP変異体、p-Hydroxytyrosineミダゾリンを形成するために、別のAequorea分子に対する絶対的な必要性はない。この変異体の両方の変異は、GFPが、遺伝子発現の変化を報告し得るスピードにおける制限である。

変性タンパク質または変性体を含む準備ベクトルは、光を吸収するが、実質的に非発光である（Bairdら、1990）。というのは、おそらく、むき出しの発色団が

遺伝子迅速技術において有用である。

## 1. グリーン蛍光タンパク質（GFP）遺伝子

グリーン蛍光タンパク質遺伝子および遺伝的タンパク質は、表1に示されるように、個々の生物体において、存在していると考えられる。このような遺伝子が発現する位置の生物発光調節物および調節物由来のgfp遺伝子は、本発明に従って、ヒト化gfp遺伝子を調整するための出発点として使用される。

表1

グリーン蛍光タンパク質（GFP）を産生する生物発光調節物および調節物

門/綱	属	参考文献
刺胞動物	Aequorea	MorrisおよびBasilings, 1971
	Obelia	MorrisおよびBasilings, 1971
	Phialidium	MorrisおよびBasilings, 1971
	Nitrocras	Praschke, 1995
	*Campanella	MorrisおよびBasilings, 1971
	*Clusia	MorrisおよびBasilings, 1971
ヒドロコエラ	Solenastrea	MorrisおよびBasilings, 1971
	*Diapora	MorrisおよびBasilings, 1971

刺胞動物	Aequorea	Wamplerら、1973
	Phialidium	Wamplerら、1973
	Stylaster	Wamplerら、1973
	Aequorea victoria	Wamplerら、1973

バインダーのグリーン蛍光から推測されるGFPの存在

現在、A. victoria由来のgfp遺伝子配列が、容易に入手可能であるため、ヒト化gfp遺伝子を作成するためのテンプレートとして使用されることが好ましい。

gfp遺伝子配列の生物学的に機能的同等物はもちろん、本発明に包摂されるが、遺伝子を切断するための試みが、発光が消失する前に、たった1つの残基がアミノ酸末端、そして10または15以下残基がカルボキシ末端から置換に示れることが示された（DopfおよびBorlaug、1995）ことを留意すべきである。それゆえ

、構造でもないか、溶解分子による攻撃から保護されてもいないからである。発色団形成は、もちろん、いずれの有用なGFP変異体または融合体において維持を保持したままで行われなければならない。

BorlaugおよびBorlaug報告では、37°Cで発現されるGFPは、15°Cで発現されるGFPよりも発光が強い。したがって、適切に成熟したGFPの発現レベルまたは明るさを低減させることによるよりはむしろ不適当な成熟化を生じさせることにより作用する（Borlaug、1995）。

蛍光フィルターで励起した野生型Aequorea GFPは、同様の発光分子よりも約10倍強い。355nmへの励起の交換は、役に立たない、というのは、このような波長は、迅速な光異性化を生じ、そしてまたバックグラウンド自己発光より励起するからである。

## 3. GFP変異体および変異

本発明のA. victoriaからクローニングされるGFPは、上述のような強い明るさ、タンパク質合成と蛍光発現と融合体光異性化との間の最適なバランスを含むいくつかの最適化ではない特性を有する。しかし、GFPは、これらの欠点を軽減するか克服するため、および励起および発光波長がシフトされ、異なる色および新しい用途を支持するための、第二世代の化合物を提供する目的のために再構築される。

GFPにおけるほとんどの変異体は、相対的な発光または発光ピークにおいて顕著な変化のない、発光の部分または完全な欠陥を生じる。これらの変異体は、おそらく、タンパク質の折り畳み、発色団の形成不全、または不十分な発光による発光の喪失（quench）を起因する。遺伝子を切断する試みは、発光が消失する前に、1つの残基のみアミノ酸末端から置換に示れる。そして10または15以下の残基がカルボキシ末端から置換に示れることを示した（DopfおよびBorlaug、1995）。主要なトランジェクションに対するGFPの非変異は、おそらく、それはどのくらいのことではない、というのは、タンパク質発現は、発色団を合成し、そして同様の水から溶解に溶解されなければならない。

GFPポリペプチドにおけるアミノ酸置換は、異なるスペクトル特性を有するタンパク質を生じることがすでに報告されている。変異体のリビセットは、おそらく

く発色団の脱プロトン化を促進するか、または阻害する。395nmおよび475nmにおける発光ピークの割合に影響する。例は、T2011 (Thr→Ile) およびT222 (Glu22→Gly) であり、これらは、それぞれ、395nmまたは475nmのいずれかにいて単一の発光ピークに対するスペクトルを単純化する (Ehrigら、1995)。変異体1167T (Ile→Thr) は、2つのピークの野生株の割合を、どちらかを完全に増減させることなく変換させる (Ehrigら、1994)。

第二の変異体のサブセットは、実質上、有意に変化した特徴を有する新しい発色および発光スペクトルを生産する。この型の変異体の例は、発色領域そのものの中に見いだされる。

#### (a) Tyr残基変換

Aequorea由来のGFPおよび海シタナクReclilla resiformisのGFPは、同一の発色団を共有し、さらにAequorea GFPは395nmおよび475nmに2つの吸収ピークを有するが、Reclilla GFPは、438nmにおける単一の吸収ピークのみを、Aequoreaタンパク質の主な395nmピークよりも約1.5倍強いモノマー発光強度で、有する。多数の変異の適用について、Reclilla GFPのスペクトルは、AequoreaのGFPよりも好ましくあり得る。というのは、異なる発光と共鳴エネルギー移動の放出との間の波長の差は、換成スペクトルが、狭くかつ広いよりはむしろ狭く低い場合、より簡単であるからである。

さらに、Aequorea GFPのより短い波長の吸収ピーク (475nm) は、発光フィルターセット (set) にとって好ましい特性であり、そして光漂白に耐性であるが、光漂白により感受性であるより短い395nmの吸収ピークより、低い値を有する (Chalfieら、1994)。前述の理由のため、Aequorea GFP発光スペクトルの単一ピークへの変換は、このように、より長い波長が望まれる。

このような変換は、GFP変異体および変換されたスペクトルを有するGFP変換体を準備するスクリーニングを促進したReclilla (1994) により達成された。中心チロシン (Tyr) の他の芳香族アミノ酸 (Trp、HisまたはPhe) による置換は、発色および発光スペクトルを進行的により短い波長にシフトさせる。

Reclilla (1994) は、ヒドロキシルアミン処理 (SikorskiおよびBocke、1991)

を用いて、そして0.1M NaCl、50mM GTP、および700mMのGTP、GTPおよびGTP (Chalfieら、1992) を用いるpH7.0の緩衝液を増強させることによってGFPのランダム変異研究を実施した。導管上のコロニーは、475nm/395nmにおいて反応され、キセノンランプで照射され、そして出力ビームが全体の培養液を照射するために必要とするためのモノクロメータで波長を付ける場合、異なる発光色および明るさの割合について系統的にスクリーニングされる。

野生型タンパク質の種と対比的にGFPおよび発光のブルーにより発色可能な変異体は、Reclillaにより準備された (1994)。最大発色および発光は、野生型GFPの最大発色および発光から、それぞれ、14および40nmの波長的にシフトされた。決定的なタンパク質の変異体は、発色団の中心にTyr66→Hisへの置換を含んだ。Tyr66Hisの発光スペクトルは、タンパク質が、変化するまでの置換には敏感ではなく、このことが、発色団が極度に接近可能でないこととさなる証拠を提供する。

トリプトファンおよびフェニルアラニンのチロシンのさらなる部位特異変異研究が実施された (Ehrigら、1994)。トリプトファンは、チロシンとヒスチジンとの間の中間の発色および発光波長を与えたが、わずかな発光のみであり、これは、おそらく、折り畳みまたは発色団構造が不完全である一方で、フェニルアラニンは発色可能な発光を与えなかったためである。

Tyr66→His変異体は、野生型GFPよりも発光が少ないが、これはおそらく、別のアミノ酸が、中心洞に良好に適合していないからであり、もちろん、これは置換変換である。異なる最大発色および発光を有するGFPのいくつかの置換の利用可能性は、下記のように異なる置換変異の2色評価、発光およびタンパク質輸送 (trafficking) が可能となる。

#### (b) Ser残基変換

ReclillaのGFPにはるかに近いスペクトルを有するGFP変換体を作製する所望はまた、Reclilla (1995) の研究を動機づけた。AequoreaGFPのアミノ酸配列のセリン63は、Hisヒドロキシベンズリデンイミダゾリノン発色団の部分となる。Ser63がピニル基を形成するためのさらなる脱水素化を実施するという仮説を検証

するために、Reclilla (1995) この変異体はAla、Leu、CysまたはThrに変異させた。ピニル基が部分的または部分的に除去により形成される場合、SerおよびCysは、除去が不可能なAlaおよびLeuとは異なる異なる同一のスペクトルを与えるはずである。

Reclilla (1995) は、その結果、同じ分子数も野生型GFPのそれよりも4倍から6倍強力である。470-490nmに位置づけられる単一の発光ピークを有する4つの変異体を作製した。これらの結果は、ピニル形成を排除する。Ser63→Thr変異体は、さらなる特徴付けのために選択された。というのは、これが発色および発光の最も長い波長 (490nmおよび510nm) であり、Reclilla GFP (495nmおよび505nm) について報告される発色および発光波長に非常に類似しているからである。

新生のポリペプチド鎖から発光を産生するための決定的な置換変換は、野生型タンパク質 (Reclilla、1995) におけるより、GFPにおいて約4倍迅速に進行した。この加速は、迅速な置換下置換のためのレポータータンパク質としてのGFPの使用における潜在的に重要な置換を改善する。

Ser63のArg、Asn、Asp、PheおよびTrpへの変換は、発光強度を野生型の強度よりはるかに低くした。

まとめると、Ser63Thr GFP変異体 (Reclilla、1995) の有利な特性は、以下を含む：各々が、その最も長い波長ピークにおいて発色される場合野生型より約6倍

より強い強度；野生型より4倍迅速な置換変換への置換；および光活性化がないことおよび非常に強い光漂白のみ。前述の発見は、Ser63Thrが、空気乾燥したpH7.0の緩衝液中で、438nm照射における約7分の1の強度で光漂白する。Ser63Thrの発色強度は、これらの条件下で約7分の1の強度であるので、Ser63Thrの光漂白の量子収率は、約4分の1の強度であると計算される。

これらの利点は、長波長で発色または光活性化が必要である場合以外ほとんど適用について、Ser63Thrを、野生型GFPより強力なものにする。これは、特に、一般に入手可能な発光イソシアネート (FITC) フィルターセット (450-480nm照射) を使用するより高度な感受性を提供する。

#### (c) 緑の着色シフト変異体

DeLagrangeら (1995) はまた、GFP発色4-5の異なるランダム変異研究を実施し、そしてスペクトルが上記のSer63変異体に類似する6つの変異体を準備した。そのうち4つは、上記の列挙した6つで同じ置換基 (Leu、CysまたはAla) を有した。

スペクトル的にシフトしたGFP変異体の構築のためにDeLagrangeら (1995) によって使用された方法は、以前に最適化した組み合わせた変異研究およびデジタル画像分光分析 (DIS) (GoldmanおよびTowres、1992；DeLagrangeおよびTowres、1995) を使用してスペクトル的に異なる個々のバクテリオクロロフィル結合タンパク質を産生するために使用されている。

DISは、空間的に解析したスペクトル情報を得ることにより、ペトリ皿での数千のコロニーを直接に同時スクリーニングを可能にする (Towresら、1995；Towres、1994)。異なる成長で観察したペトリ皿の画像は、荷電耦合デバイス (CCD) カメラによりとられ、そして置換測定の校正を確立するソフトウェアによりさらに処理される。最適化された組み合わせた変異研究およびDISを用いて、さらなるGFP変異が準備される。

DeLagrangeら (1995) のコンビナトリアルライブラリースクリーニングにおいて、変異研究のために簡便化したGFP置換は、Phe64とGlu69 (Phe Ser Tyr Gly Val Glu；配列番号4) との間の6つのアミノ酸配列であり、これは、発色団の

も含む。変異オリゴヌクレオチドは、66位に芳香族アミノ酸を取り込むことを好み、他の5つのコドンには完全にランダムになるようにランダムに置換された。変異研究のために使用されるオリゴヌクレオチドの配列は、Cyberlopeコンビュータープログラムを用いて得られた。

得られた約3×10<sup>5</sup>の変異GFP遺伝子のライブラリーは、M21 (DIS) で発現された。ペトリ皿上の数千のコロニーを、DIS (DeLagrangeら、1995) を用いた発光によりスクリーニングした。スペクトル的にシフトした変異体は、最初に、490nm光で照射した場合に観察されるグリーン発光により同定される。これは490nmで照射した場合に消失する。対照的に、野生型GFP発光は、490nm照射よりはるかに明るい。DISは、104コロニーにつき約1個が機能的发光タンパク質を発見する

ことを明らかにした。

DeLagrangeら(1995)は、いくつかの単色シフトGFP(ESGFP)クローンを思い出し、そして配列決定した。Tyr68およびSer67は、保存されているように見られたが、他の4つの部位はより少なくストレンジであった: Ser65は、観察される変異型には必要ではなかった。ESGFPは、容易に野生型GFPから区別される。なぜなら、その最大吸収は、野生型Aequorea GFPにおける390nmからESGFPにおける430nmと、約100nm赤シフトするからである。1つの特定のクローンはESGFP4であり、これは、発色団配列Met Gly Tyr Gly Val Leu (配列番号5)を有する。ESGFP4の発光は、ほとんど野生型GFPの発光と同一であるが、励起スペクトルが非常に異なる。

DeLagrangeら(1995)は、この配列特徴が指紋的アンサンブル変異体(Espectral Ensemble Mutagenesis) (EEM) および再アンサンブル変異体(Recursive Ensemble Mutagenesis) (REM) 戦略(DeLagrangeおよびCourtin, 1998; DeLagrangeら, 1998)によるさらなる操作に影響を受け、多スペクトルの発光タンパク質の「レインボー」を断片的に産生することを可能にした。REMまたはEEMにより最適化された新しいコンビナトリアルライブラリーを構築することにより、無数の変異体の可能性が、顕著な発光シフトを有する稀有クローン(rare clone)の単離を可能にするのに充分高くなることが予測される。

#### 4. ヒト化gfp遺伝子

野生型GFPの特性が変異体において、上記のように改善されるにも関わらず、野生型GFPは、各々のタンパク質分子が数々の発色団または発光分子を生成する真の酵素的レポーター基に組み入れられる細胞の1つの段階を欠落している。各々のGFPが、GFP発現の比較的低レベルな1つの発光団を産生する、細胞当たり100個の分子が、明るいうツナルを与えるのに必要であり得る(Chishtiら, 1995)。

上記は、本発明の重要な(哺乳動物およびヒト細胞における増加したGFP発現のために提供される本発明の利点)を説明する。上記の変異体の各々または所望の変異体または変異体のパネルがまた、本発明で提供されるようにヒト化バック

グラウンドにおいて調製される。これは、本発明のヒト化局面が、タンパク質の配列を断片的に変換するからである。

哺乳動物細胞におけるGFPを発現する以前の試みは、Kozak配列(Adamsら, 1995)を使用してきた。このように変換したgfp遺伝子は、哺乳動物発現ベクターに挿入され、CDO-K1細胞(Adamsら1997)において使用されてきた。Pines(1996)はまた、一過性のGFP発現(CO-7, HeLa, およびR11)3T3細胞を報告している;そしてKisliouら(1995)は、GFPのインクタンパク質におけるミトコンドリアにおける発現を報告している。しかし、これらの研究は、比較的低いレベルの発現を反映していると考えられており、さらに、多量の毒素により得られたネガティブな結果と対照されると考えられる。これらの少ないポジティブな結果は、細胞に導入された高コピー数のgfp遺伝子の結果であると考えられる。

本発明者によりとられたアプローチは、Adamsら(1995)の方法に反対であり、そして哺乳動物細胞における発現により適切であるようにコンド使用を改良するために、低濃度を含む低pHを使用することによってヒト細胞環境におけるGFP mRNAの質的な翻訳効率に依存し、このようなヒト化構築物を使用することにより、ヒト化gfp遺伝子の低コピー数(例えば、10以下の範囲で、そして特定のヒト化gfp変異体を使用した場合に1または2でさえも有り得る)を有する細胞におけるグリーン発光を生じる。

EMLの量と、タンパク質発現速度における各々のコドンの相対との間の

相対は、E. coli, 酵母, および他の生物体(BennettらおよびHall)(1992); Graingerら, (1993); Graingerら(1993); Ikemura(1981a; 1981b; 1982); Ikemuraら(1990)について記載されている。しかし、コドン変換が実際に、任意の与えられた遺伝子で行われるまで、それらの翻訳効率および全体の発現レベルへの影響は確立され得ない。これは、Kozak配列に関連する状況に類似しており、これは、予備にも関わらず特にgfpの哺乳動物細胞における発現増加に寄与するとは考えられていない。本発明者らがヒト化gfp遺伝子発現について効果的であることを示した現在、GFP技術の有用性が顕著に増進される。

クラゲgfpを本発明に従ってヒト化するために、本発明者らは、まず、gfp遺伝

子のコドンの詳細な分析を行った。表2は、クラゲgfpコドンとヒト遺伝子で共通に置かれるコドンとの間の比較の結果である(Pinesら, 1998)。これが、本発明者らが、gfpと一般的にヒト遺伝子配列との間の重要な差異を特定し、そしてされるべき変換を特定することを可能にした。

本発明による、ヒト化配列の例は、配列番号3によって示される。しかし、本発明のヒト化配列の配列番号3の代表的な配列には全く限定されないことが理解される。むしろ、以下の指示により、当事者が、多数の異なるヒト化gfp配列を容易に調製し得る。

ほとんど使われないクラゲのコドンモヒト遺伝子でより頻密に使用されるコドンで置換した変換は有用な変換であると考えられるが、特定のコドン変換は、もちろん、他よりも好まれる。この意味で、本発明者らは、ヒト遺伝子においてはほとんどまたはほとんど全く使われない多数のgfpコドンを同定した。下記のように、このようなコドンは、本発明によるヒト化遺伝子を産生するために変換される第一の候補である。

一般的ヒト化変換体を作製するにおいて、ヒト化されるべきコドンは、本明細書中の表3にならびに表3および表4において示される情報を調べることから当事者によって同定される。例えば、表3における情報を利用するにおいて、当事者は、ヒト遺伝子において通常に使用されるそれらのコドンの頻度に対してクラゲコドンの頻度を比較し、そして任意の適切な変換を行う。例示のためだけに、アミノ酸ロイシンを考えると;コドンCUUは、gfp遺伝子中で11回使用されるが、

このコドンは、ヒト遺伝子において4番目に好ましいにすぎないコドンに相当する。ロイシンコドンUUAはまた、クラゲ遺伝子において顕著な特徴を示し、そしてこのコドンはヒトゲノムにおいて使用するための最良の選択である。従って、ロイシンコドンを改変することは、ヒト化遺伝子を調製するために適切な開始点となる。

表2の分析に従ってなされるさらなる改変は、アルギニンコドンのAGA(これはヒトゲノムにおいて4番目の選択にすぎない)をより好ましいコドン(例え

ば、GCGまたはAGG)に改変すること;セリンコドン(例えば、GCGまたはGCG)を、より好ましいコドン(例えば、GCCおよびAGG)に改変すること;スレオニコドンをAGGに最適化すること;プロリンコドンGCCの使用を避けること;アラニンコドンGCAを最も好ましいヒトコドンGCGに改変すること;酸性なグリシンコドンGGAおよびGAGの使用を避け、そしてそれらをヒト遺伝子において好ましいコドンGCCおよびGAGに改変すること;炭素に出現するバリンコドンGUAおよびGUGを改変し、そしてその代わりにコドンGAG(これはヒトゲノムにおいて明らかに好ましい)を使用すること;およびイソロイシンコドンUUAを避け、そしてこれを好ましいコドンAGUに改変することである。

2つのコドンの選択しかないアミノ酸において、本発明者らは、ヒトゲノムと比較した場合、野をgfp遺伝子は最も好ましくないコドンを選定していることに気付いた。従って、適切な変換が以下のコドンにおいてなされる: リジンに対するAGA; グルタミンに対するGAG; ヒステジンに対するGAG; グルタミンに対するGAG; アスパラギンに対するGAG; およびフェニルアラニンに対するUUA; そして、これらをAGG, GAG, GAG, GAG, GAGおよびUUAにそれぞれ置換する。

さらなる改変もまた、表3および表4における情報を考慮することからなされる。これらの改変は、容易に使用される形式で、コドン優先度に関する重要な情報を提供する。表3は、本発明のヒト化gfp構築物における使用について好ましいコドンの一覧を提供する。表4は、図1との相互参照を便利にするために、T(チミン)よりもU(ウリジン)を記入込んだ全く同一の情報である。

表3: ヒト使用について好ましいgfpコドン

アミノ酸	ヒト遺伝子において好ましいコドン					
アラニン	Ala	A	GCC	GCT	GCA	GCG
シスチン	Cys	C	TGC	TGT		
アスパラギン酸	Asp	D	GAC	GAU		
グルタミン酸	Glu	E	GAG	GAA		
フェニルアラニン	Phe	F	TTC	TTT		
グリシン	Gly	G	GGC	GGO	GGA	GGT
ヒスチジン	His	H	CAC	CAT		
イソロイシン	Ile	I	ATC	ATT	ATA	
リジン	Lys	K	AAG	AAA		
ロイシン	Leu	L	CTG	CTC	CTA	CTT
メチオニン	Met	M	ATG			
アスパラギン	Asn	N	AAC	AAT		
プロリン	Pro	P	CCC	CCU	CCA	CCG
グルタミン	Gln	Q	CAA	CAA		
アルギニン	Arg	R	CGC	AGG	CGG	AGA
セリン	Ser	S	AGC	TGC	TCT	TCA
スレオニン	Thr	T	ACC	ACA	ACT	ACG
バリン	Val	V	GTC	GTT	GTA	
トリプトファン	Trp	W	TGG			
チロシン	Tyr	Y	TAC	TAT		

左のコドンは、ヒト遺伝子における使用のために最も好ましいコドンを示し、ヒト使用頻度は右に向かうほど減少する。

二重下線コドンは、ヒト遺伝子においてほとんど使用されないコドンを示す。

表4：ヒト使用のための好ましいコドン

アミノ酸	ヒト遺伝子において好ましいコドン					
アラニン	Ala	A	GCC	GCT	GCA	GCG
シスチン	Cys	C	TGC	TGT		
アスパラギン酸	Asp	D	GAC	GAU		
グルタミン酸	Glu	E	GAG	GAA		
フェニルアラニン	Phe	F	TTC	TTT		
グリシン	Gly	G	GGC	GGO	GGA	GGT
ヒスチジン	His	H	CAC	CAT		
イソロイシン	Ile	I	AUC	AUU	AUA	
リジン	Lys	K	AAG	AAA		
ロイシン	Leu	L	CUU	CUC	UUG	CUA
メチオニン	Met	M	AUG			
アスパラギン	Asn	N	AAC	AAU		
プロリン	Pro	P	CCC	CCU	CCA	CCG
グルタミン	Gln	Q	CAA	CAA		
アルギニン	Arg	R	CGC	AGG	CGG	AGA
セリン	Ser	S	AGC	UCU	AUU	UCA
スレオニン	Thr	T	ACC	ACA	ACU	ACG
バリン	Val	V	GUU	GUC	GUU	GUA
トリプトファン	Trp	W	UUG			
チロシン	Tyr	Y	UAC	UAU		

左のコドンは、ヒト遺伝子における使用のために最も好ましいコドンを示し、ヒト使用頻度は右に向かうほど減少する。

二重下線コドンは、ヒト遺伝子においてほとんど使用されないコドンを示す。

表3および表4における情報を用いることから、当発明は、クラゲgfpコドン TA, TTA, TGG, およびTGA (またはTAA, UGA, UAG, またはUGA) は、より好ましいコドンに改変されるべきであることを容易に認識する。一般的に、本発明では、5および6列目に挙げられるコドンは、ヒト化遺伝子を構築するにおいて、改変することが望まれるコドンを一時的に示す；4列目に挙げられるコドンもまた、ヒト化遺伝子を構築するにおいてしばしば改変されるべきである；3列目に挙げら

れるコドンは、全体において作製されることが望まれる改変の数に依存して、およびコードされる特定のアミノ酸に依存して改変されても改変されなくてもよい。1および2列目に挙げられるコドンは、野生型gfp配列に存在する場合、二つのコドンの選択しか利用可能ではない場合ではない限り、一般に適切であり、そして改変を必要としない。しかし、2列目のコドンを1列目のコドンで置換することは、特に二つのコドンの選択しかない場合、間違いない有用な選択である。この情報と考慮すると、gfp配列に改変を導入する場合、可能な部位はどこでも1列目のコドンを導入することが一般に望まれる。

前述の議論を考慮して、配列番号3の特定の配列は、本発明によって包含される多くの作製可能なものの一つであるにすぎないことは明白である。配列番号3において、33コドンは一つ以上の塩基置換を含む。332アミノ酸をコードする配列からの33コドンは、約1%の改変を示す。しかし、コドンの約10%を改変することは、発現レベルにおける有用な増大を生成し、従ってこのような遺伝子配列は本発明の範囲内にあることが推定される。クラゲgfp配列内のコドンの約15%、約20%、約25%、または約30%を改変することもまた有用であると考えられ、そして本発明のヒト化遺伝子は、上記範囲内にこれらの遺伝子配列を含む。

特定の発露環境において、導入したコドン改変の性質に依存して、gfp遺伝子のコドン使用頻度における10%改変をすることさえ必要ないかもしれない。例えば、10の最も好ましいコドンの各々が改変され、そしてヒト遺伝子における使用に最も好ましいコドンで置換される場合、得られる配列はヒト細胞および哺乳動物細胞において効率的な発現を達成し得ることが推定される。22列目から33コドンを改変することは、約1%の改変パーセントを示す。従って、以下の条件にすなわち、与えられた数の改変のみをなす場合、gfp遺伝子配列のコドン位置は、5

3, 93, 125, 150, 173, 195, 208, 236, および244にある10のコドンを改変することが一般に望まれることを考慮すると、いわゆる「4%ヒト化遺伝子」はまた、本発明の範囲内にある。多くの改変とともに、これらの主要な改変をなす場合、これらのコドンの少なくとも約7, 8, または9を改変することは、改善

された発現を伴うヒト化遺伝子を生じるに十分である。上記のように、ロイシンは、好ましくは、CTC, CTT, またはTTGによってコードされ、バリンは、好ましくは、GTGによってコードされ；そして、セリンは、好ましくは、AGCによってコードされる。

約1〜5%、約10%、約20%、または約30〜35%のコドンが改変されたgfp遺伝子配列は一般に好ましいが、所望される場合、さらなる改変がなされるべきではないという理由はない。従って、本発明にいうヒト化遺伝子配列は、完全なコドン領域内の約5%、約10%、約20%、約30%、または約30〜35%のコドン位置でヒト化コドンを含む配列であり得る。なおさらなるヒト化改変を導入することを目的として配列番号3を検討すると、さらなる最適化改変が導入される多くの位置が特定される。これらは、例えば、配列番号3のコドン位置8, 9, 14, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 31, 33, 34, 35, 36, 40, 45, 50, 51, 62, 71, 83, 93, 101, 102, 111, 115, 116, 123, 130, 132, 133, 134, 136, 142, 157, 171, 173, 174, 181, 183, 186, 209, 216, 217, 223, および239で見出されるコドンを含む。

#### 5. グリーン蛍光タンパク質の使用

レポーター分子としてのgfpの可能性は、迅速な検出（グリーン蛍光タンパク質は、標準的な長波長の光源を使用する照射で検出される）；インビトロのリアルタイム検出の可能性；マトリックスの導入を必要としない事実；および細胞的に小さな大きさ（23.9kDa）および単量体の性質（これは、タンパク質融合を容易にする）のような特性から生じる。

本発明のヒト化gfpは、これらの方法のいくつかに応答性よりも応答性を考える。従って、ヒト化gfp遺伝子は発現促進された細胞を、例えば、蛍光活性化セルソーティング (FACS) または蛍光顕微鏡によって測定するために；インビトロ

でおおよびインビトロで遺伝子発現を測定するために；多量産物における特定の細胞を標識するために、例えば、細胞系を研究するために；融合タンパク質を標識し、そして位置づけるために；および細胞内輸送 (trafficking) などを研究するために、使用される。

の標準的な生物学的な適用は、見逃されべきではない。例えば、タンパク質ゲルおよびウェスタンブロット上の分子重量マーカーとしてのその使用、蛍光計および可視化装置のキャリブレーションにおけるその使用、ならびに細胞および組織へのマイクロインジェクションにおけるその使用。

蛍光分子重量マーカーを発生する方法において、一般に、ヒト化pH感受性配列は規定されたアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする一つ以上の遺伝子配列に融合され、そして融合タンパク質は発現ベクターから発現される。発現は、マーカーとして使用され得る規定された分子重量（完全なアミノ酸の大きさの計算に従う）の蛍光タンパク質の産生を生じる。

好ましくは、制限蛍光タンパク質は、サイズ分画（例えば、ゲルを使用することによって）供される。次いで、未知のタンパク質の分子量の測定は、蛍光標本からの検定曲線を作成し、そして曲線から未知の分子量を読みとることによって行われる。

#### (b) 異なる呈色化pH

上記のように、異なる呈色形状を生産するヒト化pHにおけるアミノ酸置換は、複数のレポーター遺伝子の同時使用を可能にする。異なる呈色化ヒト化pHは、融合細胞培養物において複数の細胞集団を特定するために、または複数の細胞集団を区別するために簡単に使用され得、これはさらなる試験を添加するかまたは細胞を特定するかもしくは細胞を除去する必要がある場合にリアルタイムにおいて可視化される細胞変動または細胞動態における差異を可能にする。

他の選択は、単一細胞、組織、または器官内の複数のタンパク質の最終的な位置の追跡および決定、同一の細胞、組織、または器官において2つの異なるプロモーターからの遺伝子発現を測定するディフュゼンシャルなプロモーター分析；および融合細胞培養物のFACSソーティングを含む。

細胞内でタンパク質を産生するにおいて、ヒト化pHタンパク質発現条件は、フ

ルオレセインおよびローダミンに類似した形式で使用され、そして相互作用タンパク質またはサブユニットをタグ化し、次いで、その関連性はインタクトな細胞において蛍光共鳴エネルギー転移によって化学的にモニターされる（Adamsら

、1991；1993）。

スベクトルで分離可能なヒト化pH感受性を用いて使用される技術は、共焦点顕微鏡、フローサイトメトリー、ならびにモジュラー検出および二重検出技術を使用する蛍光活性化セルソーティング（FACS）によって例示される。

#### (b) トランスフェクトされた細胞の同定

ヒト化pHが使用される多くの技術は、特定の広い領域に分類され得る。まず細胞を簡単に同定すること。これらの方法において、ヒト化pHは、細胞においてpHを発現するために簡単に使用される。この方法についての一つの使用は、細胞を異なる細胞集団の存在する環境に曝露する前、または曝露した細胞集団または細胞の細胞の集団における使用である。元の細胞のみでのpHの検出によって、このような細胞の位置を決定し、そして全集団と比較することが可能になる。

第2の方法は、目的の細胞集団にトランスフェクトされた細胞に同定に類似する。外因性pHでトランスフェクトされた細胞を同定することは、多くのインビトロ実験環境において必要とされ、そしてまたインビトロ細胞培養においても必要とされる。

この一般的な第1の例は、コードされたタンパク質をpHを用いて直接的に同定するために、選択したタンパク質をコードする遺伝子配列にヒト化pH配列が融合される場合である。細胞においてこのようなヒト化pH融合タンパク質を発現することにより、容易に検出される蛍光性タグ化タンパク質の産生を生じる。これは、タンパク質が選択した宿主細胞によって産生されていることを簡単に確認するにおいて有用である。それによってまた、選択したタンパク質の位置を（これが天然の位置を述べているのかまたはタンパク質が人の手によってオルガネラに局在化されたかどうかを）決定することが可能になる。

外因性pHでトランスフェクトされた細胞はまた、融合タンパク質を産生することなく同定され得る。ここで、この方法は、少なくとも2つの異なるまたは別

単位を含むプラスミドまたはベクターを受容した細胞の同定に依存する。第1の単位は、所望のタンパク質をコードし、そしてその発現を指示し、一方、第2の単位は、ヒト化pHをコードし、そしてその発現を指示する。第2の単位または

選択単位からのpHの同時発現は、ベクター含有細胞が検出され、そしてベクターを含有しない細胞から区別されることを可能にする。

#### (c) プロモーターの解析

本発明のヒト化pHはまた、哺乳動物細胞におけるプロモーターの解析に利用の元を提供する。pHは、哺乳動物細胞およびヒト細胞において発現され得、そして容易に検出され得るので、ある細胞のプロモーターが、所定の遺伝子、組織、または系を用いる使用のためのそれらの適合性について試験され得る。これは、インビトロ使用に（例えば、細胞発現および高レベルタンパク質産生における使用に適したプロモーターを同定するにおいて）適合し、そしてインビトロ使用に（例えば、細胞培養試験においてまたはヒト細胞での遺伝子治療において）もまた適合する。

実証的な用途において、プロモーターを解析するために、コントロール細胞または系がまず樹立される。コントロールにおいて、陽性の結果は、公知でかつ効果的なプロモーター（例えば、本明細書中で記載される研究の特定の局面において好ましいpHプロモーター）を使用することによって確立され得る。候補プロモーターを試験するために、発現ベクターまたは遺伝子構築物において異なるプロモーターが存在することを除いては、全ての条件が同じである別の細胞または系が樹立される。コントロールと同じ期間および同じ条件下でのアッセイの実施後、選択的なpH発現レベルが決定される。これにより、候補プロモーターと参照された標準プロモーターとの強度または適合性の比較が可能になる。所定の研究において日常的に用いられるpH発現系を使用するにおいて、陽性コントロールは、試験プロモーターの特定の研究においては、省略してもよい。

この模式において試験され得るプロモーターはまた、候補細胞特異的プロモーターおよび候補組織特異的プロモーターを含む。細胞特異的プロモーターを試験することによって、所定の細胞を用いる使用に好ましいかまたは最適なプロモーターである細胞の同定性のあるプロモーターから同定し、提供し得ることが可能になる。さらに、これは、インビトロおよびインビボで両方でも有用である。細胞発現およびタンパク質産生において所定のプロモーターおよび所定の細胞型の組

合せを最適化することは、最も高い可能なレベルが達成されることを確認するためにしばしば必要とされる。

本発明のこれらの局面は、分画細胞を用いるタンパク質産生における使用のための候補プロモーターを解析するために使用され得る。これらの実施態様において、プロモーターから発現されるpHは、細胞から細胞外環境（次いで、そこでpHは検出される）におそらく分泌される。

調製プロモーターの試験的かつ研究的使用は、本発明の別の局面を形成する。タンパク質産生の目的のための細胞発現において、細胞培養または細胞集団の特定の時期で細胞を調製することが所望され得る。細胞または所定の系における所定のタンパク質の分泌を解析するにおいて、特定の条件下（例えば、特定のサイトカインまたはホルモンの存在下）でのみスイッチが入られるプロモーターを使用することはまた有用である。

細胞特異プロモーターを用いるヒト化pH遺伝子の使用はまた、プロモーター自身の解析にまで及ぶ。本明細書での例は、遺伝子を置ける電気の生物において発現されることが公知であるプロモーターのある例（例えば、熱ショックタンパク質と関連するプロモーター）からの特定のプロモーターの解析である。この方法において、例えば、分泌で作用可能なプロモーターは、それが哺乳動物細胞においても作用可能かどうか決定するために、そして、それゆえ、哺乳動物細胞が、分泌プロモーターのホモログをおそらく含むかどうかを決定するために、取得され得、そして哺乳動物細胞系において発現され得る。

組織特異的プロモーターおよび組織特異プロモーターの使用は、インビトロ実験環境において特に有力である。動物における組織用遺伝子を発現させる例において使用される場合、このようなプロモーターの使用によって、所定の組織で、所定の部位および/または規定された条件下でのみの発現を可能にする。これは、遺伝子発現を、特定の組織、組織、または領域に限定することを可能にし、そして費りの身体を通して遺伝子発現を制御する重要な利点である。癌の治療においてしばしば用いられるので、組織特異的発現を達成することは、特定の遺伝子治療（例えば、細胞傷害性因子の発現）において特に重要である。有益な

14

効果を得る等の治療用遺伝子を発現するにおいて、当然、組織特異的発現にまた、それが治療効果を最適化する点において好ましい。

適切な組織特異的および誘導性プロモーターは当業者に熟知である。例示のためのために、肝臓癌組織結合 (FAB) タンパク質遺伝子プロモーター (大腸上皮癌に特異的)；インスリン遺伝子プロモーター (膵臓癌に特異的)；トランスフィレン (transferrin)；α-アンチトリプシン、プラスミノーゲンアクチベーター-インヒビタータイプ1 (PAI-1)；γ-グロブリンタンパク質AおよびBの遺伝子プロモーター (骨髄腫細胞において特異的または優先的な発現を指向する) が挙げられる。膵臓癌において特異的なプロモーターとしては、ミエリン遺伝子タンパク質 (GFAP) 遺伝子プロモーター (神経細胞に特異的)；グリコ糖脂タンパク質 (GFMP) 遺伝子プロモーター (グリコ糖脂に特異的)；および特異的組織に特異的である特異的酵素遺伝子 (GSE) プロモーターが挙げられる。

インビトロ使用のための誘導性プロモーターは、好ましくは、生物学的に適合的な因子、好ましくは、通常、規定された動物細胞において出会う因子に反応性であるプロモーターを含む。一例は、ヒトA1-1プロモーターであり、これは胎毒因子によって誘導される。さらに適切な例は、デトクローM450遺伝子プロモーター (種々の毒素および他の因子によって誘導される)；熱ショックタンパク質遺伝子 (種々のストレスによって誘導される)；ホルモン誘導性遺伝子 (例えば、エストロゲン遺伝子プロモーター) などである。

電磁放射線によって誘導されるプロモーターはまた、特定の実施形態において、特にガン治療において使用される。ここで遺伝子発現は電磁放射線 (例えば、γまたはX線) に誘導されることによってガン細胞において局所的に誘導される。電磁放射線によって誘導性である適切なプロモーターとしては、pG-1、fos、およびlucが挙げられる。

#### (d) スクリーニングプロトコル

本発明のヒト化gfpとともにプロモーターを使用することのさらなる例は、スクリーニングプロトコルにおけるその使用である。これらの実施形態 (これら

は、一般的にインビトロで行われる) において、遺伝子操作された細胞は組成物における特定の化合物または因子の存在を測定するために使用される。

スクリーニング実施形態において、ヒト化gfp遺伝子は規定することが望まれる因子によって誘導されることが公知であるプロモーターの下流に位置づけられる。細胞におけるgfpの発現は、正常にはサイレントであり、そして選択された因子を含む組成物に細胞を暴露することによってスイッチが入れられる。例えば、重金属、毒素、ホルモン、サイトカイン、または他の規定された分子に反応性であるプロモーターを使用するにおいて、重金属、毒素、ホルモン、サイトカインなどの存在は、容易に決定される。

前記の列挙から、本発明のスクリーニング局面は2つの基本的な面に分けられ、それは簡便に用語「生物学的」および「化学的」と呼ばれる。

生物学的アッセイにおいて、生物学的なエフェクター分子によって誘導性であるプロモーターの制御下のヒト化gfp遺伝子を含む細胞は、種々の質量的生物学的サンプル (これは血液、血清、唾液、尿、唾液などを含む) 中のこのような分子の存在を検出するために使用される。このような方法で検出可能であるこれらのエフェクター分子は、ホルモン、サイトカイン、神経伝達物質などの分子を含む。当然、細胞を通過して使用される場合、用語「プロモーター」は、任意の調節エレメントを包含するために使用されることが理解される。本明細書における特定の例は、所定の組成物中のステロイドを検出するためのヒト化gfpと併用するステロイド調節エレメントの使用；血管系エレメント (これは、VE、EGF、FGF、およびTNFαによって誘導される) の調節の使用である。

いわゆる化学アッセイにおいて、化学的因子によって誘導性であるプロモーターの制御下のヒト化gfp遺伝子を含む細胞は、種々の組成物中の化学的因子の存在を検出するために使用される。これらのアッセイは、液体 (例えば、飲料水など) 中の毒素または汚染物を検出するために使用される。この方法で検出される因子のタイプは、重金属、毒素、および他の種々の汚染物ならびに汚染物の化学製品を含む。

当然、任意のスクリーニングアッセイは、所定のプロモーターからの遺伝子発現を阻害するか、加速するか、またはそうでなければ、ダウンレギュレートする

因子を検出する場において使用されることが理解される。このようなネガティブ効果は、遺伝子発現が阻害因子の存在に反応して「スイッチを切る」場合に生じる蛍光のレベルの減少および既減された蛍光によって検出可能である。

#### (e) FACS分析におけるgfp

多くの慣習的なFACS法は、抗体抗体に結合した蛍光色素の使用を必要とする。蛍光色素でラベルされたタンパク質は、FACS装置における抗体に対して好ましい。なぜなら、細胞は蛍光タグ化試薬とインキュベートする必要がなく、そして抗体結合物の非特異的結合によるバックグラウンドがないからである。蛍光は安定であり、そして低非効率性であり、いかなるマトリックスも抽出する必要もないので、gfpはFACSにおける使用に特に適切である。

他の発現実施形態において、所望のタンパク質は、gfp融合タンパク質を調製し、そして細胞内で発現させることによって直接的にgfpで標識される。gfpはまた、上記のように所望のタンパク質を発現する発現ベクター内で第2の転写または翻訳単位から同時発現される。また、gfpタグタンパク質を発現する細胞またはgfpを同時発現する細胞は、FACS分析によって検出され、そしてソートされる。FACS分析は、レポーター遺伝子としてgfpを使用する場合、遺伝子発現およびプロモーター活性をモニターする有用手段として使用される。

(gfp自身もまた使用され得る) 赤方偏光gfpは、FACSを用いる使用に特に適切である。ほとんどのFACS装置で用いられるアルゴンイオンレーザーは、488nmで放射し、したがって、赤方偏光gfp変体の遺伝子 (例えば、鳥卵白は約600nm) は、野生型gfpの赤方より効果的である。FACS装置を用いるgfpの首尾良い使用は、本明細書中に示される。

#### 6. gfp融合タンパク質

ヒト化gfp遺伝子は、融合タンパク質の一部として使用される。これはタンパク質の位置を測定することを可能にする。「外因性」タンパク質とgfpの融合物は、gfpの蛍光および宿主タンパク質の機能 (例えば、生理学的機能および/または薬理的機能) の両方を保持すべきである。

gfpのアミノ末端およびカルボキシル末端の両方は、任意の所望のタンパク質

と実際に融合され得、同定可能なgfp-融合物を作製する。野生型遺伝子を使用し、調製されたgfp-本質タンパク質の融合物の両方が報告されている (NagyおよびHaeberle, 1994)。gfpのカルボキシル末端へのタンパク質の融合は、リンカー配列によって増強されるかもしれない。

#### (a) 細胞下位

局在化研究は、細胞下位によっておよび免疫蛍光によって以前に行われてきた。しかし、これらの技術は、細胞内におけるある特定のタンパク質の位置の「スナップショット」のみを考慮する。さらに、人工物物が、細胞が免疫蛍光のために固定される場合、導入される。生存細胞においてタンパク質を可視化するためにgfpを使用することは、個々の細胞中で数週間を通してタンパク質を追跡することを可能にし、従って重要な技術である。

ヒト化gfpは、種々の条件下で哺乳動物細胞およびヒト細胞における細胞内タンパク質輸送をリアルタイムで分析するために用いられる。細胞を固定することから生じるアーチファクトは回避される。これらの運用において、ヒト化gfpは、その細胞下の位置を異なる天然の条件下で調べるために、公知のタンパク質に融合される。

Pines (1995) は、一過性のトランスフェクションによって哺乳動物細胞培養細胞中で発現された、gfp-サイクリンキメラを作製するためのタグとしての野生型gfpの使用を記載した。予備的な実験において、gfpならびにgfp-水塩gfp-サイクリンキメラの両方が、生細胞において検出され、そして蛍光が、このような細胞において長時間追跡された。

Pines (1995) は、サイトメガロウイルス初期プロモーターを用いて、一過性のトランスフェクトされた細胞においてgfp発現を駆動させ、そしてgfpをGFP-1、GFP-2、およびGFP-3細胞において発現させた。全ての細胞において、キメラは2時間後に免疫蛍光によって検出されたにもかかわらず、蛍光が検出される前にラゲージ (15時間) が存在した。これは、細胞中で約4時間かかるgfpが自己消化するための遅延に起因し得る (Pinesら, 1995)。哺乳動物細胞におけるこれらの研究とは対照的に、本発明は、gfp蛍光が約6時間検出可能であったというはっきりとした利点を有する。

Piles (1995) および他者の研究において、GFPはタンパク質の天然の細胞下層在化を妨害しなかった。Piles (1995) は、GFPが細胞全体（核および細胞質の両方）に分布していることを示した。サイクリンAにタグ化された場合、主に核に存在することが見出され、そしてサイクリンBにタグ化された場合、それはB型サイクリンに依存して核管または小胞体と結合しながら、細胞質に存在することが見出された (Piles, 1995)。

ヒト化GFPは、実質的に任意のタンパク質をタグ化し、そして異なる条件下でタンパク質の位置を追跡するために用いられる。例えば、所定のタンパク質の、減数分裂、有糸分裂、アポトーシス、または他の細胞プロセスを通じた追跡において、所定のタンパク質の位置もまた、外的刺激の刺激に応じて決定される。このような例は、異なる物理的条件（例えば、漸増または漸減温度、およびさらに異なる化学的環境）を含む、用語「化学的環境」により、追跡される天然の刺激（例えば、塩または血糖濃度因子などの異なるレベルを有する環境）およびさらにエフェクター分子が追加されている細胞の両方を意味する。

エフェクター分子を有する細胞は、所定の細胞における応答を誘発するために用いられる。本発明のヒト化GFPは、所定のエフェクターまたはアゴニストに対する細胞の応答が決定されるアッセイにおいて用いられる。このような方法を用いることによって、ホルモン、サイトカイン、神経伝達物質、または他の因子に必要した所定のタンパク質の位置が決定される。タンパク質の位置が、変化するか否かによって変わることは、およびタンパク質が、内部区画（例えば、外膜、サイトソーム、小胞体、および核区画）間を移動することによって知られる。

#### (4) GFP細胞内化

GFP融合タンパク質の別の使用は、タンパク質の天然の行き先であるけれどもタンパク質が特定の細胞区画への輸送に反応した後の標的タンパク質の特定の細胞での輸送においてである。これを達成するために、標的化配列（例えば、核またはミトコンドリア標的化配列）は、GFP配列とともに所望のタンパク質に融合される。これは、タンパク質の位置がGFPを用いて決定される上記したばかりの方法とは対照的である。

核は、その独特の膜を媒介することによって多くのタンパク質を含む。これ

らのタンパク質は、それらが生成されるサイトソルから移入される。これは、核の内部（核内腔）に到達するためには、核の外膜および内膜の両方を通り抜けて通過しなければならない。この輸送プロセスは、選択的である：サイトソルで生成された多くのタンパク質は、核から除外される。多くの核タンパク質は、孔チャンネルを拡大しながら核中へタンパク質を低圧に輸送する。孔路上に局在するレセプタータンパク質と相互作用する。

核輸送の選択性は、核移行シグナルに存在し、それは核タンパク質においてのみ存在する。核移行シグナルは、いくつかの核タンパク質において遺伝子操作技術を用いて正確に規定されている。タンパク質のどこにでも局在されるシグナルは、正に荷電したアミノ酸リジンおよびアルギニンが豊富であり、そして高塩プロリンを含む長いペプチド（代表的には4〜8アミノ酸残基）からなる。例えば、T抗原核移行シグナルは、Pro Pro Lys Lys Arg Lys Val（配列番号5）である。

ヒト化GFPは、標的物（この中で、問題のタンパク質が、GFPおよび核標的化配列に融合される）の発現の後に、選択されたタンパク質が核内に移入されたことを確認するために用いられる。これは、基礎科学におけるインビトロ研究の一部として、またはインビボ治療の一部として（例えば、癌細胞の核への電荷の増進において）さえ用いられる。

核標的化シグナルのヒト化GFP伝達子への添加はまた、発現されたタンパク質の蛍光強度を、核のよりずっと小さな空間にタンパク質を局在することによって増強させるために用いられる。これは、本明細書中で実施例IIIにブルーGFP発現体の細胞において記載される。

核タンパク質分子は、（例えば、有糸分裂後に）繰り返し移入される必要がある。その核移行シグナルペプチドは、核への移入後に切断されない。典型的に、一旦タンパク質分子が、任意の他の膜貫通オリゴマー（membrane-banded oligomer）によって移入されると、それはその区画内で世代から世代へと受け継がれ、そして再びトランスロケーションされる必要がない。それゆえ、これらの分子上のシグナルペプチドは、タンパク質トランスロケーションの後にしばしば除去される。

ミトコンドリアは、二重膜有界オルガネラであり、電子輸送および酸化リン酸化によるATPの合成に特化されている。それらのタンパク質のほとんどは、細胞核によってコードされ、そしてサイトソルから移入される。さらに、お移入タンパク質は、それが特定の特定の区画に多量に存在しなければならない。ミトコンドリアには、4つの区画がある：マトリックス空間；内膜；膜間空間；およびサイトソルに面する外膜。これらの4つの区画のそれぞれは、異なるセットのタンパク質を含んでいる。

ミトコンドリアの生合成の研究は、酵母（融合タンパク質（組換え核膜技術によって生成される）をコードするハイブリッド遺伝子が効率的に導入される）の使用によって非常に進んでいる。ミトコンドリアマトリックスへ移入されるタンパク質は、これらの遺伝子のポリヌクレオチドから抽出されてから1〜2分以内に、通常サイトソルから取り込まれる。

移入されるタンパク質は、たいがいいつもシグナルペプチド（20〜40残基）をそのアミノ末端に有する。移入された後、シグナルペプチドはミトコンドリアマトリックス内の特定のプロテアーゼ（シグナルペプチダーゼ）によって迅速に除去され、たいがいおそらくマトリックス内でアミノ酸に分解される。シグナルペプチドは、長くは簡単であり得る。シグナルペプチドの長さが連続的に減少される分子遺伝子実験は、1つのミトコンドリアタンパク質について、ミトコンドリア移入を台無しにするために、12のアミノ酸のものがアミノ末端で必要とされることを示している。これらの22残基は、任意の細胞質タンパク質に付着し得、そしてタンパク質をミトコンドリアマトリックスへ誘導させる。

全長シグナルペプチドの物理的研究は、正に荷電した残基が全てヘリックスの側面に露出し、一方非荷電の残基が反対側に向かって露出する。両親媒性のαヘリックス構造を形成し得ることを示唆する。ミトコンドリア移入配列の例は、Met Leu Ser Leu Arg Glu Ser Ile Arg Phe Thr Lys Pro Ala Thr Arg Thr Leu（配列番号7）である。

ミトコンドリア膜間空間へのいくつかの膜タンパク質の輸送は、マトリックスへのそれらの最初の移送で開始される。ここで、通常に疎水性なアミノ酸配列は、戦略的に移入を促進するアミノ酸シグナルペプチドの後ろに置かれる。一

旦アミノ末端シグナルがマトリックスプロテアーゼによって切断されると、疎水性配列は、内膜にタンパク質を再移入するためのシグナルペプチドとして機能する。マトリックスからのこの移送は、おそらく内膜へのタンパク質移入に用いられる膜タンパク質の構造によって起こり、そしてこれはミトコンドリア内でコードされるタンパク質を内腔中へ移入するために用いられる構造でもある。サイトソルからミトコンドリア内腔へのタンパク質の輸送もまた、疎水性シグナルペプチドを必要とする。

生体内でのミトコンドリアの動きを可視化するためのGFPおよびミトコンドリア標的化配列の使用は、Bischoff (1995) によって報告されている。ローグミンのような色素とは対照的に、GFPを用いることは、オルガネラ電位を喪失させる薬物によってミトコンドリア内で喪失された形態学的変化が明らかになった。

これらの研究において、Bischoff (1995) は、チトクロームCオキシダーゼのサブユニットVIIの前駆体のアミノ末端アミノ酸（これは、ミトコンドリア標的化配列を形成する）をコードする短いフラグメントを融合タンパク質コード配列の一部として用いた。キメラC配列をアミノ末端からカルボキシル末端へ、以下をコードするように作製した：ミトコンドリアシグナルペプチドおよびチトクロームCオキシダーゼタンパク質の6アミノ酸；いくつかのリジン-アミノ酸；およびGFP。この結果は、ミトコンドリアへ移入されたGFPを発現した。

ヒト化GFPの使用は、Bischoff (1995) によって記載されるタイプの研究（ここでは、単にミトコンドリアを全体として標的化することが所望されている）の改良である。ヒト化GFPはまた、選択されたタンパク質が、標的物（この中で、所望のタンパク質がGFPおよびミトコンドリア標的化配列に融合される）の発現の後にミトコンドリアへ移入されることを確認するために用いられる。ここで、ミトコンドリア標的化配列は、融合タンパク質の3'末端に（コード領域の3'末端に）位置されるべきである。

#### 7. 遺伝子治療

遺伝子治療は、一般に、遺伝的障害を矯正し得る遺伝子の宿主ゲノムへの組み込みを必要とする。宿主ゲノムにおいて、この遺伝子は、宿主細胞と共有

し、そして複製し、そして欠損遺伝子を修復するレベルで発現される。典型的には、疾患は、1つまたはいくつかの遺伝子によって遺伝的副作用なしに治療される。現在までに使用された遺伝子治療に対するいくつかのアプローチがあった。これらの各々は、本発明のヒト化gfpとの組合せから選定を受け得る。

1つのアプローチは、目的の遺伝子を含むDNAを、例えば、細胞を化学的にまたは物理的にいすれかで透過化処理することによって、細胞中にトランスフェクトすることである。このアプローチは、一般に、一時的に身体から取り出され、そして処置の細胞傷害性に対して耐性であり得る細胞（すなわち、リンパ球）に限定される。リンパ球はシウム塩（GrubbsおよびDierckx, 1978; Kippes, 1990; 正定デキストランKoppel, 1980; エレクトロポレーションGrubbs, 1984; Potler, 1984）および直接マイクロインジェクションが、このような方法の例である。

特定の遺伝子および細胞膜ペプチドで形成されたリポソームまたはタンパク質複合体が、インビボおよびインビトロトランスフェクションのために使用される（Stevenson, 1992; Torchilla, 1992; Zha, 1992; Ledley, 1987; Nicola, 1984; NicolaおよびSene, 1980）。そしてポリリジン-糖タンパク質キャリア複合体にカップリングしたDNAもまた用いられる。

この形式での遺伝子伝達の効率、一般に非常に低い。目的の遺伝子は、1,000〜100,000のうち1つの細胞のみのゲノムに組み込まれることが予想される。組み込みの非存在下では、トランスフェクトされた遺伝子の発現は、組み込みの分解に起因して、増殖細胞において数日または非増殖細胞において数週間限定される。本発明は、所望のトランスフェクトされた遺伝子をより長い時間発現する細胞を容易に特定するために使用される。

Jiao (1993)は、細胞膜における遺伝子の移送および発現のためのパーティクルボンバードメント風分選遺伝子移送プロトコル（particle bombardment-mediated gene transfer protocol）の成功を記載する。このことは、これがこのような遺伝子への遺伝子移送のための効果的な方法として使用され得ることを示唆する。

プラスミドは、ヒト化gfp遺伝子物質を細胞中に直接移送するために用いられ

る状況において、本発明は、前臨床的開発段階において、そしてまた最終的な遺伝子治療をインビボでモニタリングするための両方で用いられる。

さらなる方法は、他のウイルス（例えば、ワクシニアウイルス（Jagowsky, 1988; MitchellおよびSinden, 1988; Comar, 1980）; 欠損型肝炎ウイルス（Gervais, 1980; Chang, 1991）; アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルス（AAV; Murakami, 1992; 以下を参照のこと）を用い、これらは遺伝子移送のためのベクターとして作用するように操作される。外來遺伝物質を受容し得るいくつかのウイルスは、それらが感染する細胞の範囲において限定されているが、これらのウイルスは、高感染性遺伝子発現をもたらすことが実証されている。アデノウイルスは、それらの遺伝子物質を宿主ゲノム中に組み込まず、そしてそれゆえ遺伝子発現のための宿主複製を必要とせず、それら迅速な、効果的な、異種遺伝子伝達に対して適切にしている。アデノウイルスおよびAAV（米国特許第5,121,841号、本明細書中に参考として引用される）は、本明細書中以下に記載される。ここでもまた、本発明は、前臨床的開発において、および治療の例に用いられる。

本発明の発見は、生物学的分離において周知であり、そして以下の節でさらに記載される特定の技術とともに用いられる。

#### 8. 生物学的機能の等価物

先に述べたように、疾患および疾患の予防の観点においてなされる、そしてなお同様のまたはそうでなければ所望の機能を有する分子を得る。例えば、タンパク質構造における特定のアミノ酸が、感知し得るほどの機能の損失なしに他のアミノ酸で置換される。従って、種々の置換が、ヒト化gfpタンパク質の配列において、正確となるDNAを生成することによって、それらの生物学的有用性または活性の感知し得るほどの損失なしになされ得ることが示唆される。

分子の限定された部分内でなされる、かつなお等価な生物学的活性の受容可能なレベルを有する分子を生じ得る置換の意に制限があるという概念が、生物学的に機能するタンパク質の構造において周知であることもまた、当業者によって十分に理解される。例えば、実質的に置換されたgfp遺伝子が生物学的に機能

得る（Miller, 1998）。それゆえ、DNAセグメントそれ自体は、送達因子として

用いられる。DNAセグメントを用いるための技術は、最近開発され、そして一般に「遺伝子クレンジング」と呼ばれる（Chen, 1993）。現在、細胞が核のDNAを取り込み、そしてコードされたタンパク質を発現し得ることは公知である。

この技術、およびその改良（例えば、Wang, 1993; Tang, 1993; Chen, 1993; Pyan, 1993; Wang, 1993; およびMulligan (1993)）により記載され、本明細書中に参考として引用されるもの）の利用が、DNAを細胞に送達するために用いられ得る。非核性細胞、細胞核、および遺伝子複製（Pyan, 1993）が用いられ得る。

用いられる別のアプローチは、ウイルスが細胞に侵入し、それら自体の遺伝物質をそれらにもたらす天然の能力を利用する。レトロウイルスは、それらの遺伝子を宿主ゲノムに組み込み、大量の外來遺伝物質を移送し、広範囲の細胞に感染し、そして特定の細胞株中でパッケージングされるそれらの能力に起因して、遺伝子送達ベクターとしての期待を有する（Miller, 1992）。

種々のレトロウイルスベクター（例えば、単純ヘルペスウイルス（米国特許第5,231,841号、本明細書中に参考として引用される）、サイトメガロウイルスなど）がMiller (Miller, 1992)に記載されるように用いられ得る。単純ヘルペスミジンキナーゼ（HSV-K) 遺伝子は、レトロウイルスベクター系を用いて細胞中に送達されている（そこで、遺伝子伝達ウイルス細胞シクロビルに対する感受性を破壊した）（Culver, 1992）。

第二世代レトロウイルスベクターを用いた遺伝子送達もまた報告されている。Kassambara (1994)は、モロニーマウス白血病ウイルス（これは、通常マウス細胞のみを感染する）の操作された複製体を調整し、そしてこのウイルスが特異的にエリスロポエチン（EPO）レセプターを保有するヒト細胞に感染し、そして感染するようにエンベロープタンパク質を改造した。これは、EPO配列の一部をエンベロープタンパク質に挿入し、新たな融合特性を有するキメラタンパク質を作製することによって達成された。

上記のような送達系は、本発明と関連して用いられ得る。レトロウイルス複製

の等価物でないことがすでに説明されている。

しかし、本発明の状況において、疾患または疾患の完全な欠損を有す

るタンパク質を生じない限り、生じるタンパク質は、本発明の目的のために生物学的に機能する等価物であると考えられることもまた記載される。実際、異なるタンパク質の特性を有するタンパク質を生じるアミノ酸置換は、本発明の範囲内にある。これは、発色領域外部および発色領域外部の置換を含む。

#### 9. 部位特異的変異誘発

部位特異的変異誘発は、ヒト化gfp遺伝子のさらなる複製体を調製するために用いられ得る。部位特異的変異誘発は、基礎となるDNAの特定の変異誘発を通して、種々のペプチド、または生物学的に機能するタンパク質もしくはペプチドの配列において有用な技術である。この技術は、1つ以上のヌクレオチド配列変異をDNAに導入することによって変異体を調製し、そして配列決定する準備ができた能力をさらに提供する。

部位特異的変異誘発は、所望の変異の正確な配列をコードする特定のオリゴヌクレオチド配列、ならびに預められた欠失領域の両側に安定な二重鎖を形成するのに十分なサイズおよび配列複雑性を有するプライマー配列を提供するために十分な数の単独ヌクレオチドの使用によって変異体の生成を可能にする。代表的には、変えられた配列の送達部の両側に約5〜10個のヌクレオチド長のパライマーが好ましい。

部位特異的変異誘発の技術は、特許によって開示されているように（Miller, 1993）、一般に当該分野で周知である。理解できるように、技術は、代表的には、一本鎖および二本鎖の形成の両方で存在するファージベクターを用いる。部位特異的変異誘発に有用な代表的なベクターは、M13ファージ（Messing, 1981）のようなベクターを含む。これらのファージは、容易に市販されていて、そしてそれらの使用は、当業者に一般に周知である。二本鎖プラスミドもまた、目的の遺伝子をプラスミドからファージへ移行する工程を排除した部位特異的変異誘発において日常的に利用される。

一般に、本明細書に従う部位特異的変異誘発は、まず一本鎖ベクターを得るこ

17

と、またはその配列内にgfpまたはヒト化gfpをコードするDRA配列を含む二本鎖ベクターの二本の鎖を融解分離することによって行われる。所望の空質配列を保

右するオリゴヌクレオチドプライマーは、一般に合成的に、例えばCreas (1978)の方法によって調製される。次いで、このプライマーを一本鎖ベクターとアニリングさせ、そして変異保有遺伝子の合成を完了するためにDNA合成化学薬品(例えば、E. coliポリメラーゼII(クノウフウダメント)に属する、従って、ヘテロ二量体)が形成され、ここで一方の鎖は、元の非変異型配列をコードし、そして第二の鎖は、所望の変異を保持する。次いで、ヘテロ二鎖鎖ベクターを用いて、適切な宿主(例えば、E. coli細胞)を形成転染し、そして変異された配列配座を保持する細胞株ベクターを含むコロニーを選抜される。

適切な注釋はまた、本明細書中で参考として採用される米国特許第1,888,228号に記載されている。

部位特異的変異誘発剤を用いる選択されたヒトtsp遺伝子の配列改変体の調製は、線粒体中に有用なtsp型を生成する手段として提供され、そして決定することを経験しない。なぜなら、tspの配列改変が得られる他の方法が存在することである。例えば、所望のヒトtsp遺伝子をコードする置換ベクターは、変異原性の因子で処理され、配列改変体を得る。(ヒドロキシルアセンを用いるプラズマ処理)の変異誘発については、例えば、Eichelsdorf, 1979によって記載された方法を参照のこと。

前述の方法は、変異病変における便用に通切であるが、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) の使用が、ここでは一般に好ましい。この技術は、所望の変異を所定の PCR 反応中に導入するための迅速かつ効果的な方法を提供する。以下の文は、所定の配列によってコードされるアミノ酸を変更するために用いられ得るような、適変異を配列に導入する特定の PCR の使用を特に記載する。本方法の通化はまた、配列中に何個かの塩基配対を導入するためのにも通切である。

この方法において、合成オリゴヌクレオチドは、増幅されたセグメントの一端に塩基を組み込むように設計される。PCR法に較べ、増幅されたフラグメントは、クレンジアップフラグメントで処理することによって平頭末端化され、次いで、こ

フラグメントをサブクロニングし、そして点変異をチェックするために、2つの増幅フラグメントを、平水増殖法によって、産菌に消化されたベクター中にサブクロニングする。これは、*E. coli*を形質転換するために用いられ、該いてこの*E. coli*から、プラスミドDNAがミニプレップを用いて高純度される。次い

で、正確な定量が生成されたことを確認するために、プラスミドDNAの増殖された部分はDNA配列決定によって分析される。Taq DNAポリメラーゼがさらなる変異をDNAフラグメントに導入し得るので、これは重要である。

点検員の導入はまた、建設用PVC工器を用いて与えられる。この手順において、成員を包含する2つのフラグメントが互いにアニーティングされる。そして最後にプライムされた合成によって仲仕される。水いで、このフラグメントは、第2のプライム工程によって増幅され、それにより上記のプロトコルも必要とされる平均水増産倍を回復して与える。この方法において、テンプレート添加の調整、オリゴヌクレオチドプライマーの生成、および第一のPVC増幅は、上記のように行われる。しかし、このプロセスにおいては、高濃度されたオリゴヌクレオチドは、テンプレート塩に約1倍～約10倍の塩基のストレッチについて相対であり、そしてまた塩基塩基はすべてに重複しなければならない。

第2のPCR法手順において、各増幅されたフラグメントおよび各異性化剤プライマーを用い、そして約10～約15サイクルのPCRを、上記の条件を用いて行う。再び、フラグメントをサブクロニングし、そして反変異が正確であったことを実際に確認した工程を用いてチェックする。

以下の方法のいずれかの使用において、可能な限り小さなフラグメントを準備することにより変異を導入することが一般に好ましい。もちろん、オリゴヌクレオチドの融解強度のようなパラメーターはまた、一般に位置および方法の両方により影響される。注意深く考慮されるべきである。これらの方法の実行および必要な場合のこれらの最適化は、当業者に公知であり、そして特許の文獻（例えば、Current Protocols in Molecular Biology, 1995（本明細書中に参考として併用される））にさらに記載される。

## 10. 発現プラスミドおよびベクター

の平素本増化されたフラグメントは、配列分析を容易にするためにベクター中に挿入され、そしてサブクローニングされる。

発見しようとするテンプレートDNAを複製するために、DNAを高コピー

ヌクレオチド（例えば、dCTP）中に、定着される領域に隣接する制限部位を用いてサブクローニングする。ここで、テンプレートDNAをプラスミドミックス増殖を用いて複製する。制限剤に基づき、所望の点変異を含む、そして増幅が阻害部位に隣接する適切なオリゴヌクレオチドプライマー、は、自動化合成装置を用いて合成される。プライマーがテンプレートDNAに対して約15塩基長相同であることが、一般に必要とされる。プライマーは、通常ホウリウアルキルアミドが電気泳動によって精製され得るが、これは、PCR法における使用に絶対には必要と必要ではない。ここで、オリゴヌクレオチドの5'末端がリン酸化される。

テンプレート開始は、所望の反応を含むオリゴヌクレオチドプライマーを用いてPCRによって増幅される。増幅産物中の $3'$ の末端は、一般に約15bpである。一般に、約40~25サイクルのPCRが以下のように行われる: 35℃で55秒の変性; 55℃で2分間のハイブリダイゼーション; そして72℃で2分間の伸長。PCRは、一般に72℃で約10分間の最後サイクルの伸長を含む。最後の伸長工程後、約5単位のクレンジングフラグメントが反応混合物に添加され、そして約50℃でさらに15分間インキュベートされる。クレンジングフラグメントのエキスプレッション性は、平準化されたクローニングのために末端を平準かつ適切にするために必要とされる。

得られる反応混合物は、増粘が予想された主成分を生じたことを確認するために、赤外線分析・ガロスラム電気泳動またはアクリルアミド/電気泳動によって一度に分液される。次いで、反溶媒を加え、脂肪のほとんどを除去し、クロロホルムで抽出して残りの成分を除去し、溶解性フェニールで抽出し、次いで100℃エタノールで沈澱させることによって濃縮することによってプロセスする。次に、増粘されたフラグメントの約半分を、オリゴヌクレオチドにおいて使用された隣接反応で切断する制限酵素で消化する。消化されたフラグメントを低ゲル化/唐煎 (low gel/line/mix) アーゴスゲル化で精製する。

広範な種々の組織プラスミドおよびベクターがヒト細胞遺伝子を発現するために操作され、それにより細胞に貯蔵するために使用される。

本明細書中で使用される用語「発現ベクター」は、核遺伝子が哺乳動物細胞またはヒト細胞において転写される、ヒト化ip遺伝子の核遺伝子を含む任意の

タイプの遺伝子構築物を含む。本発明の発現ベクターはまた、本発明自体により提供されるように、GFタンパク質への断片を指向する、ヒト化抗体域に加えて、発現ベクターは一般に、通常の構築および使用を容易にするためにベクターにおいて用いられる制限酵素切断部位および他の機能、供給および介在DNA配列を含む。

哺乳動物細胞において使用するための発現ベクターは、通常、換質剤（必要に応じて）および発現されるべき遺伝子の前に位置するプロモーターを含む。好ましくは、ポリアデニル化配位およびポリA結合部位が含まれる。リボソーム結合部位および5'UTR/スライス部位がまた含まれる。例は、SV40発現最低点16S/79S スライスドナー/スライスアクセプターシグナルである。

複製起点は、外因複製起点を含むようなベクターの構築（例えば、SV40または他のウイルス（例えば、ポリオマ、アデノ、SV、HPV）供給源由来であり得る）により図5aされ得る。か、または宿主細胞染色体複製機構により提供される。ベクターが宿主細胞染色体に組み込まれる場合、複数がしばしば十分である。プロモーターは、以下に提供される。

特定の開始シグナルが来た。数秒間の無動作のために必要とされ得る。これらのシグナルは、ATC開始コンドおよび開始配列を含む。ATC開始コンドを含む出力特性図形制御シグナルは、さらに提供されることが必要とされ得る。業者者は、作品にこれを設定し得、そして必要なシグナルを提供し得る。開始コンドが、挿入後全体の動作を決定するために、所属のコード配列のリーディングフレーム内でインフレーム（または、インフェーズ）でなければならないことは周知である。これらの非同期化制御シグナルおよび開始コンドは、文書および合成の両方の場合の駆動であり得る。強固の効率性、適切な転写エレメントおよび転写ターミネータを含むことにより開始される器itterator、316。

哺乳動物発現において、最初のクローニングされたセグメント内に含まれない場合、典型的には適切なポリアデニル化部位（例えば、5'-ATAAA-3'）を転写単位に取り込むこともまた所望される。典型的には、ポリA付加部位は、タンパク質の転写開始部位に位置する終結部位の約30〜2000ヌクレオチド（下流）に位置される。ポリアデニル化シグナルの特性は、本発明の用途に実質的に重要である

とは考えられず、そして任意のこのような配列が用いられる。ST40、ウシ成長ホルモン遺伝子およびシグナルは便利で、よく機能することが知られている。

組織特異性タンパク質の発現。高効率発現のために、安定な発現がしばしば好ましい。ここで宿主細胞は、ウイルス複製起点を含む発現ベクターを用いるよりも、適切な発現制御エレメント（例えば、プロモーター、エンハンサー、配列、転写ターミネーター、ポリアデニル化部位など）および選択マーカーにより制御されるベクターを用いて実現される。従って、ヒトc-fos配列および選択マーカーを組み合わせた使用がまた重要である。

外来DNAの導入に続く安定な発現において、操作細胞は、高化地において1〜2日間培養される。次いで選択地に切り替えられ得る。組織特異性プラスミドにおける選択マーカーは、選択に対する耐性を与え、そして細胞にその染色体中にプラスミドを安定に取り込ませ、そしてフォーカスから増殖され、次いでクローニング化され得る。細胞株に導入される。

多数の複製系が使用され得る。例えば、hsp70配列、またはhsp70遺伝子においてそれと相補的ヘルペスウイルスシグナール（HLS）（1977）、ヒボキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（hprt）（1972）、およびアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子（neo）（1982）を含むが、これらに制限されない。また、抗生物質耐性が、メトトレキサートに対する耐性を与えるbleomycin（bleo）（1981）、アミノグリコシド（418）に対する耐性を与えるkanamycin（kan）（1981）、およびハイグロマイシンに対する耐性を与えるhygromycin（hyg）（1984）の選択のための基盤として用いられる。

好ましいベクターは、組織において組織性の複製起点および典型的な宿主細胞

多数のウイルスベースの複製系が利用される。例えば、通常使用されるプロモーターは、ポリオマ、アデノウイルス3、およびシミアンウイルス40（SV40）由来である。SV40ウイルスの初期および後期プロモーターは、その両方がSV40ウイルス複製起点をまた含むフラグメントとしてウイルスから容易に得られるので、特に有用である。より小さいまたはより大きいSV40フラグメントもまた使用される。同時にラウス肉腫ウイルス（RSV）長末端反復（LTR）も使用される。

両方の特性を有するプロモーターを用いることにより、ヒト化c-fosの発現のレ

ベルおよびパターンが最適化される。例えば、特定の組織において特異的に活性なプロモーターの選択は、組織特異的発現を可能にする。このようなプロモーターは、大腸上皮細胞に特異的な肝細胞増殖因子（HGF）タンパク質遺伝子プロモーター；肺細胞に特異的なインスリン遺伝子プロモーター；それぞれ肝細胞において特異的または優先的な発現を指向するトランスフィレン（transphyren）（1981）、α1-抗トリプシン、プラスミノーゲンアクチベーター（tissue-type）（1981）、α1-抗トリプシン、および肝細胞増殖因子（HGF）タンパク質遺伝子プロモーターのようプロモーターを含む。組織において活性なプロモーターは、オリゴデンドログリアに特異的なミエリン基本タンパク質（MBP）遺伝子プロモーター；グリア細胞に特異的なグリア細胞特異性タンパク質（GFAP）遺伝子プロモーター；および神経細胞に特異的な神経特異的エノラーゼ（NSE）プロモーターを含む。

さらに、特定の化学的または生化学的シグナルに応答して調節されるプロモーターの選択は、ヒトc-fos遺伝子の組織特異的発現を可能にする。適切な誘導性プロモーターの例は、[1]-1、シトクロームP450遺伝子プロモーター、急激なショックタンパク質遺伝子プロモーターおよびホルモン感受性遺伝子プロモーター。ならびに電磁放射線により誘導可能なfosおよびfosプロモーターを含む。

上記のように、組織性プロモーターは、インビボ（例えば、遺伝子療法）およびインビトロ（スクリーニングアッセイ）で有用である。組織中の特定の化合物の存在についてのスクリーニングにおいて、組織性プロモーターの有用な導は、2、3の例として、重量濃度により活性化されるプロモーター（Frederickson, 1989）；ある範囲の毒性化合物により活性化されるシトクロームP450遺伝子プロモ

耐性遺伝子（これらはそれぞれ形質転換細胞において増殖および選択を可能にする）ことがまた重要である。

好ましいベクターにおいて、c-fosタンパク質の複製を容易にするために、6'UTRコード配列の末端で複製のクローニング部位（c-fos）がまた提供される。また、目的の遺伝子における便利な制限部位とともに、インフレーム融合物を形成させる3つの異なるリーディングフレーム内に存在するはずである。

組織特異性ベクターにおける同じプロモーターからの異なる遺伝子の協調発現は、IRESエレメント（例えば、下記のようなpSIC-1由来のポリオウイルス1等の内部リボソーム侵入部位（IRES）（1993））を用いて達成される。

#### 11. プロモーター

発現ベクターは、1つ以上のプロモーターの制御下のタンパク質コード領域セグメントを含む。コード配列をプロモーターの「制御下」におくために、一般に選択したプロモーターの約1と約50ヌクレオチドとの間の「ドット」；すなわち、3'に転写リーディングフレームの転写開始部位の「下流」を位置させる。「上流」プロモーターは、DNAの転写を開始し、そしてコードされた組織タンパク質の発現を促進する。

「プロモーター」は、細胞の合成機構または導入された合成機構により認識される。特定の遺伝子の転写を開始するために必要な順列配列をいう。本明細書中に使用されるプロモーターは、哺乳動物細胞およびヒト細胞において作用可能であるはずである。句「作用可能」とは「転写可能」を意味する。ヒトc-fos配列に隣接して正しい位置および方向にあり、c-fosポリマーの開始およびヒト化c-fosの発現を制御することを意味する。

ヒト化c-fosを発現するために使用されるプロモーターは、本発明には重要ではない。例として、ヒトサイトメガロウイルス（CMV）早期複製遺伝子プロモーターが使用されており（Thomas, 1984）、これは外生遺伝子の構成的な高レベルの発現を生じる。しかし、当該分野に周知の他のウイルスまたは哺乳動物細胞性プロモーターの使用もまた、ヒト化c-fos遺伝子の発現を促進するために適切である。

ター；種々のストレスにより誘導されるhsp70プロモーターのよう急激なショックタンパク質遺伝子プロモーター（Strinath, G., 1992; Welch, 1993）である。

#### 12. IRES

内部リボソーム結合部位（IRES）エレメントは、複製遺伝子またはポリシストロン性メッセージを複製するために使用される。IRESエレメントは、5'メチル化c-pc（ポリシストロン性）のポリオウイルスエンコーディング領域をバイパスし得、そして内部部位で複製を開始し得る（PelletierおよびSambrook, 1988）。ヒトc-fosウイルス（pSIC-1）（1993）のファミリー（ポリオおよび心臓ウイルス）の2つのメンバー由来のIRESエレメント（PelletierおよびSambrook, 1988）、ならびに哺乳動物メッセージ由来のIRES（UmelakおよびSambrook, 1993）が記載されている。上記の任意のものが本発明に有用なヒト化c-fosベクターにおいて使用される。

IRESエレメントは、異なるオープンリーディングフレームに連結される。複製のオープンリーディングフレームが一緒に転写され、各々はIRESにより分離され、ポリシストロン性メッセージを複製し得る。IRESエレメントの長所により、各オープンリーディングフレームは競争的に複製のためにリボソームに接近し得る。この様式において、複製の遺伝子（その1つはヒト化c-fos遺伝子である）は、1つのメッセージを転写するための1つのプロモーター/エンハンサーを用いて効率的に発現される。

任意の異なるオープンリーディングフレームがIRESエレメントに連結される。本発明の状況において、これは発現を所望する任意の選択されるタンパク質および任意の複製ターミナル（または選択マーカー遺伝子）を意味する。複製のタンパク質の発現が達成され得る。c-fos遺伝子を通じての同時モニタリングを行う。

#### 13. M7ベクター

アデノウイルス（AdV）は、ヒトに対して非毒性で、高効率の感染性を有し、そして非分裂細胞に感染し得るので、ヒト遺伝子療法のために魅力的なベクターである。従って、AdVは、組織特異性および動物全体の両方の哺乳動物細胞に遺伝子を伝達するために有用である（Guzik, 1993）。最近の研究は、AdVが

19

遺伝子送達のために潜在的に良好なベクターであることを実証している。Lafayette, m 1988; Zhouら, 1993; Flotteら, 1997; Walshら, 1999。組織特異的ベクターは、マーカー遺伝子 (Kapitila, 1994; Leikowiczら, 1998; Samtskiri, 1998; ShellingおよびSmith, 1994; Yoderら, 1994; Zhouら, 1994; BernsonおよびKuznetsov, 1994; Tratschlerら, 1995; McLaughlinら, 1998) およびヒト免疫系に与える遺伝子 (Flotteら, 1997; Laoら, 1994; Ohiら, 1999; Walshら, 1999; 他) 1994) のインビトロおよびインビボ導入のために普通に使用されている。最近、AAVベクターは遺伝性疾患の治療のための第1相ヒト試験のために認可されている。

AAVは、培養細胞において生体感染を行うために別のウイルス (アデノウイルスまたはヘルペスウイルスファミリーのメンバーのいずれか) との同時感染を必要とする。既存性ヘルペスウイルスであるCytomegalovirus, 1992。ヘルペスウイルスとの同時感染の存在下では、野生型AAVゲノムはその末梢を避けてヒト第19染色体へ組み込み、ここでプロウイルスとして潜伏状態にある (Collins, 1990; Samtskiri, 1998)。しかし、rAAVは、AAV Repタンパク質もまた発現されなければ、第19染色体への組み込みを制限されない (ShellingおよびSmith, 1994)。AAVプロウイルスを有する細胞がヘルペスウイルスで感染された場合、AAVゲノムは染色体からまたは細胞プラスミドから (後者) され、そして正常な生体感染が成立される (Samtskiri, 1998; McLaughlinら, 1998; Bernson, 1999; Kozlov, 1999; Kuznetsov, 1999)。AAVは、感染のために広範な宿主範囲を有する (Tratschlerら, 1994; Laughlinら, 1998; Leikowiczら, 1998; McLaughlinら, 1998)。

典型的には、組織特異的AAVウイルスは、2つのAAV末端反復配列に隣接する目的遺伝子を含むプラスミド (例えば、図2B、およびMcLaughlinら, 1998; Samtskiri, 1999を参照のこと)。ならびに末端反復を有さない野生型AAVコード配列を含む発現プラスミド (例えば、図1B、およびSmithら, 1999) を同時トランスフェクトすることにより作製される。結果はまた、AAVヘルペスウイルスに必要ないアデノウイルス遺伝子を有するアデノウイルスまたはプラスミドで感染もしくはトランスフェクトされる。このような形式で作製されたAAVウイルスストックは、

典型的にはアデノウイルスE1領域を有さない。従って、E1コード配列が除去されている細胞にヒト化cDNA遺伝子を導入するのが最も便利である。しかし、アデノウイルス配列中のヒト化遺伝子の挿入の位置は、重要ではない。ヒト化cDNA単位はまた、Karlssonら, (1998) により以前に記載されたように、E1領域ベクターにおける欠失されたE1領域のかわりに挿入される。

#### 15. 発現キット

ヒト化cDNA遺伝子を含む発現キットが、本発明の例の局面を形成する。このようなキットは一般に、適切な培養手段において、ヒト化cDNA遺伝子またはヒト化cDNA遺伝子を発現し得るベクターの両方を含む。遺伝子またはベクターは、通常的に受容可能な処方において提供される。

キットの成分が1つ以上の試料溶液において提供される場合、液体相法は本発明であり、細胞相法が特に好ましい。ヒト化cDNA遺伝子またはベクターはまた、注入可能な組成物中に処方される。この場合、容積手段自体はシリンジ、ピペット、点滴器、または他のこのような器具であり得、これらから処方物が細胞、または身体のある領域に適用されるか、あるいは動物に注入されるか、あるいは適用されてキットの他の成分と混合される。

しかし、キットの成分は、乾燥粉末として提供される。試料または成分が乾燥粉末として提供される場合、粉末は、適切な溶媒の添加により再構成される。溶媒が別の容積手段で提供されることもまた意図される。

容積手段は、一般的に少なくとも1つのバイアル、試験管、ソラスコ、瓶、シリンジ、または他の容積手段を含む。この中にヒト化cDNA遺伝子またはベクターが入れられ、好ましくは適切に配分される。第2のヒト化cDNA遺伝子またはベクター-構築物がまた提供され得、ここでキットはまた一般に、それが入れられる第2のバイアルもしくは他の容積手段を含む。キットはまた、通常的に受容可能な組成物または他の試料を含むための第2/第3の容積手段を含む得る。

本発明のキットはまた、典型的に、例えば、所望のバイアルが保持される注入または吹き込み形成されたプラスチック容器のような、バイアルを市販のための

rAAV粒子から物理的に (例えば、塩化セシウム密度勾度分離により) 分離されなくてはならないアデノウイルスにより感染される。あるいは、AAVコード領域を含むアデノウイルスベクターまたはAAVコード領域を含む細胞膜およびいくつかの全てのアデノウイルスヘルペス遺伝子が使用される (Yangら, 1994; Clarkら, 1995)。組み立てられたプロウイルスとしてrAAV DNAを有する細胞がまた使用される (Flotteら, 1995)。

rAAVベクターは、米国特許第5,139,941号および第4,794,398号に記載され、各々は参照として本明細書中に援用される。

#### 16. アデノウイルスベクター

アデノウイルスベクター、および好ましくは複製欠損ベクターは、本発明の例において使用される。例えば、ウイルスが、細胞性ゲノムからアデノウイルス初期領域1遺伝子を発現する細胞 (例えば、ヒト293細胞) においてのみ複製コンピテントであるようなウイルス初期領域1 (E1) 領域の欠失により達成される。従って、ウイルスは初期遺伝子産物を見せない正常細胞を感染しないので、これは重要である。複製欠損アデノウイルスを調製するための技術は、Kesh-ChoudhuryおよびGraham (1987); McGorrryら, (1988); ならびにClemensら, (1992) により例示されるように、当該分野で周知である。Rascheffら, (1991; 1992) およびRatcliffe-Perrinら, (1990; 1992) はまたアデノウイルスの使用を記載する。

アデノウイルスベクターが複製欠損である必要条件以外には、アデノウイルスベクターの特性は重要ではないと考えられる。アデノウイルスは、43の異なる公知の血清型または血清A-Dの任意のものであり得る。本発明の方法における使用のための条件的複製欠損アデノウイルスベクターを得るためには、更なるアデノウイルス5型が好ましい出現物質である。これは、アデノウイルス5型がこれについて大量の生化学的および遺伝的データが知られており、歴史的にアデノウイルスをベクターとして用いるほとんどの場合に使用されており、そして非発ガン性のヒトアデノウイルスであるからである。

これらの局面における使用のためのベクターは複製欠損という点で、これらは

細胞複製に含むための手段を含む。

容積の度または型に関わりなく、本発明のキットはまた、1つ以上のさらなる分子生物学試薬 (例えば、調製試薬) を含むか、一緒にパックされる。

#### 15. 組織導入

所望のクローンは、組織導入のためにヒト化cDNAと発現系に取り込まれる。実質的に任意の真核生物発現系がこの形式において用いられると考えられる。宿主細胞の選択されたタンパク質およびヒト化cDNAをコードするDNAセグメントで

の原質転写は、発現をモニターする便利な手段を提供する。宿主細胞が一般にタンパク質への翻訳のための機能的細胞を得るためにゲノム転写物をプロセスするので、cDNAおよびゲノム配列の両方が真核生物発現に適切である。

概して言えば、組織導入遺伝子として遺伝子のcDNAバージョンを用いるのがより便宜であり得る。cDNAバージョンの使用は、典型的にはcDNA遺伝子よりも1桁の単位でより大きいゲノム遺伝子よりも、遺伝子のサイズが一般にかなり小さく、そして簡便な細胞をトランスフェクトするために容易に用いられるという利点を提供すると考えられる。しかし、特定の遺伝子のゲノムバージョンが用いられる可能性は排除されない。

上記のように、異なる色のヒト化cDNAを用いて、異なるタンパク質が同じ細胞において同時発現される。そしてモニターされることが望まれる。これは、2つの異なる組織導入ベクター (各々が特定のタンパク質コード領域に置換したヒト化cDNAのコピーを有する) で細胞を同時トランスフェクトすることにより達成される。あるいは、このようなコード領域の両方を含むように1つの組織導入ベクターが構築され得、次いで1つのベクターでトランスフェクトされた細胞において発現される。

#### 17. 組織導入細胞

細胞「宿主」および「組織導入」細胞は、ヒト化cDNA遺伝子配列を含む外因性DNAセグメントまたは遺伝子が導入されている細胞ということが意図される。従って、操作細胞は、組織的に導入された外因性DNAセグメントまたは遺伝子を含む

20

ない天然に存在する細胞と区別される。従って、操作細胞は、人の手によって導入された遺伝子を有する細胞である。

培養において選択的に増殖する樹立された細胞株は、本発明の用途において使用される細胞の1群を形成する。特に使用のために意図されるこのような哺乳動物宿主細胞株の例は、VEH細胞、HsL細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞株、COS-7のようなCOS細胞、F12L、BHK、Pep2、3T3、3Y1、MDCK、A549、P12、K562、および3T3細胞である。

初代細胞株はまた、本発明での使用のために意図される。初代細胞株は、動物

またはヒト細胞から取り出された細胞であり、そして凍蔵された時間の間培養において生存し得る。このような細胞はしばしば操作され(例えば、有益な遺伝子を導入するために)、次いで細胞が本発明に導入された動物に導入される。この技術は、しばしばエクスピロ遺伝子操作といわれる。

全ての脊椎動物種の初代細胞が、動物の身体に戻されても戻されなくても、本発明の用途に使用されるヒト細胞遺伝子での使用のために考慮される。これらは例示のために、骨髄細胞、神経細胞、肺上皮細胞および肝細胞を含む。

発現、分泌または別の方法で産物または所望の因子を動物またはヒト動物体に送達するように事前に操作されている動物中のヒト細胞含有細胞はまた、本発明の用途に使用されてもよい。本発明の用途に使用される。量産的な宿主動物からそのような得られない細胞は、免疫学的適合性動物からの細胞。免疫学的に改変または調整された細胞、宿主動物における遺伝子デバイスに挿入された細胞、および/または広範には、宿主動物中で一時的な生命を有するように意図される非改変細胞であり得る。

もちろん、本発明がより直接的な遺伝子操作における使用のためによく適応するように、本発明に記載されるような任意の動物の細胞がヒト細胞遺伝子を含有することが理解される。このような細胞の全てが、本発明の用途に使用される「細胞含有細胞」の記載の範囲に入ると考慮される。これは、細胞が遺伝子を獲得する模式(例えば、トランスフェクション、感染など)に関わらず、ヒト細胞遺伝子またはベクターの1つ以上のコピーを含む動物またはヒト動物体中

の任意の細胞を含む。疾患細胞、欠陥細胞および正常細胞が全てこの様式において本発明中に包含される。

#### 1.2. 動物細胞遺伝子のクローニング

動物細胞からの細胞遺伝子がクローニング化されることがまた意図される。これらは、改変されたまたはそうでなければ所望の動物の細胞の特性を有し得、次いで本発明に従ってヒト化され得る。

動物細胞からの細胞遺伝子バンクをコードするDNA分子のクローニングは、単に、特異的DNA分子を、そしてDNAの他の部分から区別して検出するために制限

酵素とスクリーニングすることと必要とする。このようなクローニング手順の最初の工程は、適切な制限酵素ライブラリーのスクリーニングである。スクリーニング手順は、発現スクリーニングプロトコル(例えば、細胞バンク質に対して指向された抗体を用いるか、または蛍光に基づく活性アッセイ)であり得る。

あるいは、スクリーニングは、公知の制限酵素の部分を考慮して設計されたオリゴヌクレオチドプローブのハイブリダイゼーションに基づき得る。このようなスクリーニングプロトコルの操作は当業者に周知であり、そして科学文献に詳細に記載される(例えば、Sambrookら、(1989) (本明細書中に参照として使用される))。

以下の実施例は、本発明の好ましい実施例の例を含む。以下の実施例に開示される技術は、本発明の実施においてよく理解するとして本発明者に見出された既知の技術を、従って、この実施のために好ましい形式を構成すると考えられることが当業者に理解されるはずである。しかし、当業者は、本発明に開示されて、開示される特定の技術的詳細において多くの変更がなされ得、そして本発明の精神および範囲から逸脱することなく他の同様なまたは類似の結果を得ることができると理解するはずである。

#### 実施例1

##### 293細胞におけるクラーゲンPRの発現

本実施例は、293細胞におけるトランスフェクションおよび発現においてク

グラーゲンレポーター遺伝子を発現する組換えAAV(rAAV)を使用する試みを記載する。

野生型gfpを発現するAAVベクターおよびrAAVの産生

アデノ随伴ウイルス(AAV)は、現在、異なる形態に遺伝子を送達するベクターとして広範囲に用いられている。AAVの使用には多くの利点がある。例えば、明白な病原性の存在、ビリオンの高生存率、宿主特異性の低さ、送達遺伝子の長期発現、ならびに宿主免疫系および細胞免疫への比較的な非侵襲性が挙げられる。

AAVの1つの欠点は、ウイルスDNAの限定されたパッケージサイズであり、これは5,000ヌクレオチドを超過し得ない。現在利用可能なほとんどのAAVベクターは、あるレポーター遺伝子または別のレポーター遺伝子、すなわちcoliphage-ガラクトシダーゼおよびネオマイシンホスホトランスフェラーゼを含有する。これらのレポーター遺伝子は両方とも非常に大きく、AAVゲノムの限られたスペースのあまりに多くを占有する。これらの遺伝子発現に対する検出プロトコルは、互いにいくつかわりしている。

本セクションは、組換えAAVベクタープラスミド、pTetS-UF (図2A; これはクラーゲンPR遺伝子およびneoR遺伝子の両方を含有する)の調製を記載する。プラスミドpTetS (Hardy, 1994)をpTetSコード配列の供給源として用い、そしてこの遺伝子を即時複製プロモーターの制御下に配置した。ベクター産生の模式図を図2Bに示す。

最初に、プラスミドpTetS (Challinor, 1994)をSalIおよびEcoRIで消化し、Klenowフラグメントで末端を埋め、そしてNotIリンカーを添加した後に、gfp10遺伝子をpCIS (Chomch)のNotI部位にサブクローニングした。次いで、得られたプラスミド(pCIS-gfp10)をテンプレートとして用いて、CIPプロモーター、SV40イントロン、gfp10 cDNAおよびSV40ポリAデニル化シグナルを含有する組み立てセットをPCR反応で増幅した。

CIPプロモーターに特異的なプライマーはまた、BgIII、EcoRIおよびCp

グナルに特異的である)は、SalI部位発現部を含んでいた。反応生成物(NotI)は、gfp10遺伝子のポリAデニル化シグナルを、テンプレートとしてプラスミドpCIS (Chomch)を用いた別のPCR反応において増幅した。この反応における上流プライマーは、SalI部位配列発現部を含有し、そして下流プライマーはBgIII部位を含有していた。

1%アガロースゲルにおけるPCR産物の精製の後、それぞれのフラグメントをSalIで消化し、そして制限されたSalI末端によって互いに連結させた。連結産物をゲル精製し、そしてBgIIIで消化した。pCIS-gfp10-PstIフラグメント(AAT末端反応を含有する)を、プラスミドpTetS (Chomch, 1994)からゲル精製によ

って分離した。このフラグメントを、以前に消化されたプラスミドpTetS (Chomch)に由来するpTetS (II)にサブクローニングした。次いで、それをBgIII消化セット(CIPプロモーター、SV40イントロン、gfp10 cDNA、SV40ポリA)およびPstIポリ(II)を含有する)の両末端に連結した。

次いで、連結産物をPstIで切断し、そしてプラスミドpTetS (II) (Stratagene)にサブクローニングした。これは、PstI-リンカーを挿入し、そしてポリリンカー領域を含有する内部3'UTRフラグメントを除去することによって(図2Bおよび2CのPstI部位をPstI部位に交換することにより改変されている。得られたプラスミドをpTetSと命名した。

ポリオマウイルス由来の293Tジミニキナーゼ遺伝子プロモーターおよびエンハンサーによって駆動されるneoR遺伝子カセットを、プラスミドpCIS (Stratagene)をNotIで切断し、Klenowで末端を埋め、SalI リンカーを添加し、そしてSalIで消化することによってこのプラスミドから取得した。neoカセットを含有する293Tフラグメントをゲル精製し、SalIで消化したpTetSのSalI部位にサブクローニングした。得られた構築物、pTetS-UFを図2Bに示す。

組換えAAV (rAAV) ウイルスを産生するために、293細胞をpTetS-UFおよびヘルパープラスミドpTetS (組換えを有さないwt AAVゲノムを含有する Chomch, 1994)で同時トランスフェクトした。同じ細胞にまた、感染多量度(m.o.i.)10でアデノウイルスを感染させた。

細胞を3回凍解および解凍し、56℃で3時間4分を熱不活化させ、細胞片を濃心沈降させ、そして4時間40分時に75μlローターで形成されたc11グラジエン（1.4kg/ml）を通してウイルスを精製することによって、組換えAAVを60時間後に回収する。グラジエンを分離し、そして密度を顕微鏡によって測定した。1.38g/cm<sup>3</sup>と1.4g/cm<sup>3</sup>との間の密度を有する部分をゾールし、そして0.05μmの網に対して4時間透析した。AAV部分を感染中心アッセイ（Okauchi et al., 1993）によって決定した。

野生型gfpの低レベル発現

pTet-pプラスミドDNAを293細胞にトランスフェクトさせた場合、GFPを発現

する細胞の平均数は通常5%未満であった（図3）。さらに、組換えAAVを感染させた293細胞（同一のGFP発現カセットを保有する）を、GFP陰性であると仮定して解凍した。これらの2つの研究の間の違いは、外見上は、各細胞に送達されたGFP cDNAの量であった。トランスフェクションの間、数回またはさらに数回のプラスミドコピーが送達され、一方、Okauchi（1）未満の条件下での感染は、単一コピーのみの濃度を送達する。

従って、gfp10 cDNAが、Challinor（1994）によって最初に記載されたように、電圧刺激およびヒト細胞で発現された場合に正しいレポーターであることを本発明者らに見出した。明らかに、哺乳動物およびヒト細胞におけるgfp10の発現が増強される新規技術が必要とされている。

#### 実施例II

##### ヒト細胞においてGFP発現を増大させる試み

本実施例は、哺乳動物およびヒト細胞においてgfp10の発現を増大させる試みに使用し得る幾つかの方法を記載する。

所定のプロモーターの制御下にある所望の遺伝子産物の量を増加するいくつかの可能性のある方法が存在する。このような方法の1つは、タンパク質/遺伝子相互作用および輸送を通してプロセッシング/スプライシング経路にプレヘンシブを配向するイントロン配列を導入することにより成熟の安定性を増大させるように試みることである。

哺乳動物細胞におけるGFP発現を改善する前述のよく知られる技術の失敗に陥らして、本発明者らは、このような細胞におけるGFPの低発現の重要な理由の1つが細胞膜におけるgfp10の正しい膜配向であると仮定した。本実施例は、哺乳動物およびヒト細胞における増大したGFP発現を得ることに使用するためのヒト化GFPの発現を記載する。

タンパク質の低発現は、所定の細胞における成熟の正しい成熟率から生じて得る。例えば、ヒト細胞膜は、特定のセットのイソ受容体（これは他の種と異なる）によって特徴づけられる。実際に、膜および膜タンパク質の両方における同種コドンの選択が強く偏っていることが知られている。また、分類

学的に遠い生物の遺伝子の機能または遺伝子間（同系タンパク質をコードする遺伝子間でさえ）の特異性に陥らず、同一または分類学的に関連した生物の異なる遺伝子の間でコドン用法において明白な類似性が存在する（Gratwick et al., 1991; Ikemura, 1990; Ikemura, 1991）。

生物間のコドン選択パターンにおける差異は、イソ受容体（同様の膜タンパク質）における差異およびアンチコドンや位置の異なるヌクレオチドにおける差異に起因する（Ikemura, 1991; Ikemura, 1992）。同種コドン選択は、合成されたタンパク質の特性に影響しないが、遺伝子の発現速度に関連する（Besteisen et al., 1993; Ikemura, 1991; Ikemura, 1992; Ikemura, 1993）。コドン用法と（GC含量との間の相関の程度は、個々の遺伝子の産生レベルに関連することが見出されている。

従って、本発明者らは、クラグgfp10のコドン使用頻度を調査し、そして1450のヒト遺伝子の合計のコドン使用頻度の平均（Wada et al., 1998）と比較した。gfp10 cDNAの配列の分析により、このクラグ遺伝子のコドン使用頻度がヒトゲノムにおいて広く用いられているものとは全く異なることを示した。例えば、クラグpF（配列番号2）の18、53、125、178、195および198位のLeuアミノ酸残基；203位のSer；ならびに93、150および214位のValは、ヒト遺伝子（配列番号1）におけるコドン）ではほとんど全く用いられないトリプレットによってコードされている。互いのアミノ酸もまた、劇的に違いがヒトとは異なる頻度を示す。

本発明者らのGFP発現カセットは、5'40後遺伝子162/195スプライスドナー/スプライスアクセプターシグナルを含有していた（図1B）。この配列は、文献中でしばしば用いられるが、その効果は可変的であり、そして遺伝子特異的であり得る。従って、本発明者らは、この技術手続ではヒト細胞におけるGFP発現を劇的に増大しないと考えた。

外系タンパク質を他のタンパク質またはポリペプチドドメインに融合することによってその外系タンパク質の安定性を増大させることもまた考えられる。これについては、第2のコード領域へのクラグ配列の融合を可能にするベクターが利用可能である。しかし、本発明者らは、これがgfp10配列の欠点を適切に置換する

とは考えていなかった。

タンパク質収率を増大させる別の可能性のある方法は、其成熟の過程の開始を容易にする配列を導入することによって翻訳効率を最大化させることである。このような配列の1つは、ATG開始コドン直前に先行するKozakコンセンサス配列（Kozak, 1981; Kozak, 1997）である。さらに、ATGコドンの約14ヌクレオチド下流に位置する最適に配列されたステアロカーブヘアピン構造が用いられる（Kozak, 1990）。

しかし、gfp10の上流に位置されたKozak配列が発現効率を劇的に低下させなかったことが知られている。従って、Kozak配列の一般的な有用性、およびgfp10と組み合わせてKozak配列を使用する先行文献の明確な示唆にもかかわらず（例えば、F（出願公開第05/07453号を参照のこと）、gfp10のKozak配列上流の導入は、却って成功しなかったようである。

本発明者らは、配列が阻害されたままであるので、Kozak配列によって授けられる開始におけるいかなる増大もgfp10発現において顕著な増大を産生しないと考えた。翻訳効率問題に取り組むことに際する別の方法とKozak配列との組み合わせにより利益が生じ得ると考えられていたのにもかかわらず、この欠点がKozak配列単独の有用性を強く固定すると考えられていた。

#### 実施例III

##### ヒト化GFPの設計

従って、本発明者らは、クラグGFPをコードする成熟ヒト細胞膜において低効率で翻訳され、産物の後遺伝子のために不十分な量のタンパク質しか産生しないと考えたので、本発明者らは合成バージョンのクラグgfp10を設計した。この合成（またはヒト化）バージョンのgfp10は、ヒトゲノムにおいて優先的に用いられるコドンを選択し、本来のgfp10に存在するまれなコドンまたはより少ない頻度で用いられるコドンを置換した。

#### 実施例IV

##### ヒト化GFP遺伝子およびベクターの構築

本実施例は、実施例IIIに記載される分析の結果を用いて、哺乳動物細胞およ

びヒト細胞での増大した発現において使用するためのヒト化GFPの生成を記載する。

合成塩基置換を、88コドンにおいて、アミノ酸配列（図1）を変更することなく作製した。さらに、pTet-gfp10中のGFPタンパク質の開始コドンの直前の配列を変更して、Kozakコンセンサス配列を生成した。また、コドン198を、Challinor（1994）に記載のように、アルギニンと対照される、野生型グルタミン酸（Glu）（199）に元に戻した。この構築物（pTet-gfp10）と称される）を、以下のように複製した。

gfp cDNAを、相互にプライミングする合成オリゴヌクレオチド（図1を参照のこと）をアセンブリすることにより合成した。gfp10遺伝子をほぼ等しい長さの8つのセグメントに分け、そして4つの対のオリゴヌクレオチドを合成した。各対は、短い配列の重複（図3、下部）を有する2つの重複オリゴからなり、一方はセンス鎖をコードし、他方はアンチセンス鎖をコードする。アニーリングおよびSequenaseによる伸長の後、対1および2をEaeIで消化し、一方、対3および4をKpnIで消化した。次いで、消化産物を、2つの制限の反応で連結した：オリゴ1を2へ、そしてオリゴ3を4へ。最後の長さの連結産物を、5'αゾリアクリルアミドゲル上で、非変性条件下で精製した。次いで、両側フラグメントを、EcoRIで消化し、そして互いに連結した。

最終産物を、一片のオリゴヌクレオチドを使用して、PCR法において増幅

5'-(CGAAGTTGGGCGGCTCACTTGTACAGCTGGTGCAT)-3' (序列编号 1 D)

### 生態例 Y

以下の改良バージョンは広範囲に適用され、特に異なる色の増強されたバージョンで使われる。究極のF7およびF7（ブルー-蛍光タンパク質）は、顕著しない異なる発色スペクトルおよび蛍光スペクトルを有することにより、独立した検出を可能にする。2 重タグを、2 つ以上の蛍光標識タンパク質のいずれかを発現す

蛍光をモニターするために、CsCl-精製したrAAV-GFP<sub>10</sub>を用いて、10の $10^6$  CFUの293細胞を感染させた。感染後36時間で、細胞を、Eaton Filter Cube #41818 (F-10) (35 $\mu$ l/25mm<sup>2</sup>あたり)を使用して蛍光顕微鏡で写真を撮影した。あるいは、



## 組換えGFPアデノウイルスの構築および使用

この実施例は、組換えアデノウイルスシャトルプラスミドの構築、およびヒト化pEGFP2遺伝子を発明する組換えアデノウイルスの構築を記載する。ここでは、ヒト化pEGFP2における異なるベクター系の使用を示す。

アデノウイルスシャトルベクター-pΔEGFP (図2B)を構築するために、pプラスミドpIT-EGFP1で部分的に消化し、次いでpEGFP1で完全に消化した。EGFPプロモーター、イントロン、IRESエレメント、EGFP cDNA、およびp3'UTR 5'UTRからなる低分子量セットを、アガロースゲルから分離した。このフラグメントを、BamHIおよびSalIで消化したpΔEGFP1 (Bettis, 1990) にサブクローニングした。

組換えアデノウイルスを構築するために、シャトルベクター-pΔEGFP (Bettis, 1994) およびΔベクター-pIT17 (Gibco, 1994) を、供給者 (Microbia Biosciences Inc.)

によって提供される手順を使用して、293細胞に同時トランスフェクトした。組換えΔを含むブラークを、典型的な細胞毒性効果 (CPE) を示す群やかなグリーン細胞の群について、エビ蛍光 (epifluorescence) Fでの視覚的選択によってスクリーニングした。組換えΔを、組換えEGFPと各付け、そして標準的な技術を用いて増殖させた。

pΔEGFPを、アデノウイルスゲノムpIT17 (Gibco, 1994) の型を含むプラスミドとインビトロで組換えする場合、EGFPを有し、そしてそれを発現する組換えアデノウイルスが生成された (図8)。EGFPレポーター遺伝子は、組換えΔブラークの容易な選択を可能にした。蛍光顕微鏡によって調べた場合、別の組換えブラークは、典型的なアデノウイルスCPEを示す群やかなグリーン細胞の密集した (confluent) 群から分離されたが、他の組換えブラークは、グリーン細胞を含まなかった。高のブラークに対する他のブラークの比は、pΔEGFPシャトルプラスミドとpIT17ドナープラスミドとの混合使用する場合、約1:2であった。従って、EGFP選択の使用は、スクリーニングプロセスを有意に単純化した。

## 実施例五

## モルモットの光レセプター-細胞の感染

この実施例は、ヒト化、cGMP、cAMPの発現、および分化した哺乳動物細胞におけるレポーター遺伝子としてのその使用を記載する。

pEGFP2を、モルモットの網膜を感染させるために使用した。モルモットを、ケタミン (5mg/kg体重) およびキシラジン (8mg/kg) の混合物の腹腔内注射によって麻酔した。それぞれの眼を、2.5%のフェニレフリン (Neo Symparine) および0.5%のトロピカミドで麻酔させ、そして局所麻酔 (プロパライネ) (1) を角膜に投与した。前房の穿刺により、眼圧を下げた。30ゲージ針を網膜後部の視覚的な網膜の下で網膜中の毛様体輪に挿入し、そして25μl pEGFP2 (2.5×10<sup>7</sup>の感染性粒子) を送達した。眼を、蛍光および炎症部位について検眼顕微鏡によって検査した。

注射後24時間で、動物を麻酔し、そしてケタミンKClの筋肉内注射し、続いて、

ペントバルビタールナトリウムを腹腔内に注射投与して致死させた。ついで、動物を、0.1MのPBS中の4%のパラホルムアルデヒドを使用して固定した。眼を摘出し、そして水晶体および角膜を取り除いた。網膜および球座、一晩4℃でさらに固定した。次いで、網膜を、7.5%、15%、および30%のスクロースに浸漬し、そして20-25μmの厚さで凍結切斷した。組換え本を、ソルオレイン膜/放射フィルムを付いて、Bradaの共焦点顕微鏡上で可視化した。

EGFP cDNAの、インビトロ系におけるレポーター遺伝子としての有用性を試験するために、本発明者らは、2系統の株の1376のモルモットの右眼の網膜に、pEGFP2ウイルスを注射した。網膜の組織切片は、神経細胞染色 (網膜体注射に最も近い層) の細胞において優先的に、弱いEGFP2蛍光を明らかにした。さらに、いくつかの扁平細胞は、EGFP2蛍光を示した。EGFP2の最も強い強度は、網膜色素上皮 (RPE) の細胞において見られた (図9A、図9B、図9C、および図9D)。

pEGFP2について、試験した各組織切片は、蛍光を有するEGFP2細胞を有していた。EGFP2細胞におけるEGFPプロモーター駆動性発現に対するこの優先は、既に注目されている (Bettisら, 1994; Liら, 1994)。コントロールの左眼による組換え本の試験は、RPEの色素細胞中の自己蛍光を除いて、網膜特異的な放出を明らかにした。

かにしなかった。モルモット網膜体中のEGFP2の発現がEGFP2細胞内でEGFP2を誘導するという事実は、EGFP2が200μmの厚さの神経網膜をトラバース (traverse) し得ることを示した。この特性は、EGFP2の小さい直径に関連し得る。

## 実施例六

## pGREENANTERT-1ベクター

この実施例は、pGREENANTERT-1と呼ばれる特有用なベクターの作用を記載する。

pSPYBET 2.1を構築するために、以下のプロトコルを使用した。pSPYBET 2.1 (Life Technologies Inc., Gaithersburg, MDから入手可能) を、PvuIIおよびBssHIで消化した。末端を、クローニングフラグメントの作用によって平頭にした。より大きなフラグメントをゲル精製した。

次いで、pSPYBET 2.1 (Life Technologies Inc., Gaithersburg, MDから入手可能) を、BamIおよびHindIIIで消化した。末端を、14bpポリマーゼの作用によって平頭にした。より大きなフラグメントをゲル精製した。2つのフラグメントを連結し、そして得られたプラスミドをpΔAD-TETと称した。

pΔAD-TETを、BamIで部分的に消化し、そしてクローニングで処理した。BNAを自己連結させ、そして得られたプラスミドは、マルチクローニング部位 (MCS) に1つのみの3'末端部位を有した。MCSを、BamIおよびHindIIIで消化し、そして以下の制限部位 (BamI-BamII-HindIII-HindIII) およびpGFP1) を有する新しいオリゴを連結することで改変した。このプラスミドを、pSPYBET-3と称した。

pSPYBET-3は、BamIおよびHindIIIで消化し、クローニングフラグメントで処理した。EGFPプロモーターはpGFP2由来であった。プロモーターは、クローニングフラグメントで平頭にしたSclI-BamIフラグメントとであった。BNAを連結し、そして得られたプラスミドをpSPYBET 2.1と称した。

pGREENANTERT-1を構築するために、pSPYBET 2.1を利用した。pSPYBET 2.1をHindIIIで消化し、ウシ腸アルカリホスファターゼで処理した。BNAをヒト化EGFP2のBamIフラグメントに連結した。方向を確認した。このベクターを、pSPYBET-EGFP2と称した。

17 BNAポリマーゼ領域を、BamI-HindIIIで消化し、およびより大きなベクターフラグメントの自己連結によって欠失させた。このBNAは、pGREENANTERT-1ベクター (図10) である。pGREENANTERT-1の完全な配列を、配列番号14に示す。

## \* \* \*

本明細書中で開示され、そして請求の範囲に記載される組成物および方法の全てが、本発明の開示を考慮して高度の熟練を伴わずに行われ、そして達成され得る。本発明の組成物および方法は好ましい実施態様によって記載されているが、改変が、本発明の概念、範囲、および用途から逸脱することなく、本明細書中に記載される組成物、方法、および方法の工程または工程の順序に適用され得ることが当業者から明らかである。より詳細には、特定の薬剤 (化学的および生化学的) に関連する薬剤の両方が、同一または類似の結果が達成される限りは、本明細書中に開示される薬剤と置換され得ることが明らかである。全てのこのような置換の置換および改変が、本明細書の請求の範囲によって規定される本発明の範囲、範囲、および概念の中にあることが当業者から明らかである。

## 参考文献

本明細書中に示されるものに対して、例示の手順的または他の詳細な推論を提示する程度まで、以下の参考文献が本明細書中に参考として開示に採用される

- Adams et al., "Vectors for using given fluorescent proteins (gfp) as a reporter of gene expression and protein localization in mammalian cells", *FASEB J.*, 9(5):A1336, Abstract 8425, 1995.
- Adams et al., *in: Fluorescent Protein for Biological Activity of Living Cells: A Practical Guide*, ed. Mason, Academic, New York, pp. 133-149, 1993.
- Adams et al., *Nature (London)*, 348:694-697, 1991.
- Adelman et al., *DNA*, 2:183, 1993.
- Balch et al., "Vectors for gene transfer derived from animal RNA viruses: Transient and stable expression of transfected genes," *in: Kuchelapudi R, ed. Gene transfer*. New York: Plenum Press, pp. 117-143, 1986.
- Barnett, J., J. Wilson, D. Sun, R. Forster, and J. M. Adams, "Adenovirus Vector-Mediated *in vivo* Gene Transfer into Adult Murine Retina," *Invent. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 35:2335-2342, 1994.
- Bernstein, L.L. and R.D. Hall, "Codon Selection in Yeast," *The Journal of Biological Chemistry*, 257(5):3036-3037, March, 1982.
- Boh, A.J., W. Haddock, L. Frenkel, and P.L. Grisham, "An Efficient and Flexible System for Construction of Adenovirus Vectors with Insertions or Deletions in Early Regions 1 and 2," *Proc Natl Acad Sci USA*, 91:8960-8966, 1994.
- Bittner et al., *Methods in Enzymology*, 153:15-54, 1983.
- Chadla, M., T. Fu, G. Eberhardt, W.W. Ward, and D.C. Pridmore, "Oncogene Fluorescent Protein as a Marker For Gene Expression," *Science*, 263:802-805, 1994.
- Chang et al., "Foreign gene delivery and expression in hepatocytes using a hepatitis B virus vector," *Hepatology*, 14:134A, 1991.

- Chen, A.K., M.D. Hoggan, W.W. Harnsforth, and E.I. Berns, "In: Integration of the Adeno-Associated Virus Genome into Cellular DNA in Latently Infected Human Dermal Cells," *J. Virol.*, 33:735-743, 1980.
- Clark, K.E., T. Varghese, D.M. Prater, and P.E. Johnson, 1993. Cell lines for the production of recombinant adeno-associated virus. *Human Gene Therapy* 6:1129-1141.
- Cody, C.W., D.C. Pridmore, W.M. Ward, P.C. Prasad, and W.W. Ward, "Chemical Structure of the Hexameric Chromophore of The Aquaporin Gene-Fluorescent Protein," *Biochemistry*, 32:1212-1218, 1993.
- Cohen, " Naked DNA Polysome Way to Vaccines," *Science*, 259:1691-1692, 1992.
- Collier-Chapman et al., *J. Mol. Biol.*, 158:1, 1981.
- Cougar et al., "A general method for the construction of recombinant vaccinia virus expressing multiple foreign genes," *Gene*, 88:1-10, 1989.
- Cox et al., *J. Virol.*, 67(9):2664-2667, 1993.
- Cox et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 75:5763, 1978.
- Calver, K.W., E. Sun, Z. Wadhwani, S. Ishii, H. Ohtsuka, E.H. and E. Sun, B.M. In vivo gene transfer with attenuated vector-producer cells for treatment of experimental leukemia. *Science*, 254:1524-1527, 1992.
- Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, chapter 8, 1993.
- Curier and Ward, 1993.
- Delegrave and Yoon, "Screening sequences open to engineer proteins: Experimental results and conclusions," *BioTechnology*, 11:1548-1552, 1993.
- Delegrave et al., "Recursive assembly strategies," *Protein Engineering*, 6:327-331, 1993.
- Delegrave et al., "Red-Shifted Fluorescent Markers of the Green Fluorescent Protein," *BioTechnology*, 13:151-154, February, 1995.
- Dick, W., M. Wirth, and H. Hensen, "Eukaryotic Transcription Units for Gene Expression in Mammalian Cells," *Gene*, 128:347-349, 1993.
- Dryl and Hargison, *Fluorescent Protein and Applications Meeting*, Palo Alto, California (Abstract), 1994.

- Drig et al., *FEBS Lett.*, 367:163-166, 1995.
- Eichmann, *J. Bacteriol.*, 138:579-585, 1979.
- Finn, T.R., R. Adams, R.A. Adams, R.A. Zaitlin, P.L., and Carter, B.J. 1992. Gene expression from adeno-associated virus vector in primary epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 7:249-256.
- Finn, T.R., R. Adams, R.A., Conrad, C., McGuffee, S.A., R. Adams, R. Adams, R.A. Zaitlin, P.L., Gagliardi, W.B., and Carter, B.J. 1993. Stable *in vivo* expression of the cyclic adenosine monophosphate response element with an adeno-associated virus vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:10613-10617.
- Finn, T.R., R. Adams, R.A., and Zaitlin, P.L. 1994. Adeno-associated virus vector gene expression occurs in postmitotic cells in the absence of reverse DNA integration. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 11:517-521.
- Finn, T.R., R. Adams, R.A., R. Adams, R.A., Carter, B.J., and Gagliardi, W. B. 1993. An improved system for packaging recombinant adeno-associated virus vectors capable of *in vivo* transduction. *Gene Therapy* 2, 29-37.
- Friedman et al., *Journal of Biological Chemistry*, 268:2254, 1993.
- Frye et al., "DNA vaccines: Protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene-gun inoculations," *Proc Natl Acad Sci USA*, 90:11478-11482, 1993.
- Gil et al., *Lab. Invest.*, 68(1):12, 1991.
- Gilch-Chester and Gilch, *Molecular Biology. Rev. Comm.*, 142:944-973, 1987.
- Ginsman et al., *in: Hepatocyte Plasmid Vectors* (Ginsman, Y., ed) pp. 187-192, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, 1992.
- Goldman and Thomas, "An algorithmically optimized combinatorial library screened by digital imaging spectroscopy," *BioTechnology*, 10:1357-1361, 1992.
- Goyal, "Gene transfer method for transient gene expression, stable transfection, and cotransfection of suspension cell cultures," *Mol. Cell Mol. Sci* 188-199, 1993.
- Graham and van der Eb, "A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA," *Virology*, 52:456-467, 1973.
- Graham et al., "Codon Cloning Usage and the Oncogene Hypothesis," *Nucleic Acids Research*, 8(1):49-62, 1980.

- Greenbaum, R., C. Gantier, M. Gory, M. Ambrose, and R. Mercler, "Codon Cloning Usage is a Oncogene Strategy Modulated for Gene Expressibility," *Nucleic Acids Research*, 8(1):43-47, 1981.
- Hahn, R., A.B. Chitt, and R.Y. Taka, "Improved gene fluorescence," *Nature*, 373:60-64, February, 1995.
- Hahn, R., A.B. Chitt, and R.Y. Taka, "Wavelength Modulation and Posttranslational Autocleavage of Green Fluorescent Protein," *Proc Natl Acad Sci USA*, 91:12301-12304, 1994.
- Hopwood, P.L., and M. M. 1984. Use of adeno-associated virus as a transposon DNA cloning vector; transfection of monkey cells into mammalian tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 81:5466-5470.
- Horvath et al., "Synthesis of hepatitis virus particles that contain replication-defective duck hepatitis B virus genomes in cultured HEP2 cells," *J. Virol.*, 61:642-650, 1990.
- Ikawa, T., "Correlation Between the Abundance of Escherichia coli Transfer RNAs and the Occurrence of the Responsive Codons in Its Protein Genes," *J. Mol. Biol.*, 144:21-28, 1980.
- Ikawa, T., "Correlation Between the Abundance of Escherichia coli Transfer RNAs and the Occurrence of the Responsive Codons in Its Protein Genes: A Proposal for a Synonymous Codon Cluster that is Optimal for the E. coli Translational System," *J. Mol. Biol.*, 151:389-400, 1981.
- Ikawa, T., "Correlation Between the Abundance of Yeast Transfer RNAs and the Occurrence of the Responsive Codons in Protein Genes. Differences in Synonymous Codon Choice Patterns of Yeast and Escherichia coli with reference to the Abundance of Recognizing Transfer RNAs," *J. Mol. Biol.*, 158:577-597, 1982.
- Ikawa, T., "The Frequency of Codon Usage in E. coli Genes: Correlation With Abundance of Cognate tRNA," p. 323-334, *in: S. Ohtsuka et al. (ed.), "Genetic and Evolution of tRNA Polymers, tRNA, and Ribosomes," University of Tokyo Press, Tokyo and Elsevier/North Holland, Amsterdam, 1980.*
- Inouye and Tani, *FEBS Lett.*, 341:227-230, 1994.
- Jackson, R.L., M.T. Howard, and A. Kaminski, "The Novel Mechanism of Inhibition of Fluorescent RNA Transcription," *Trans. Fluoresc. Sci.*, 15:777-783, 1990.
- Jung, E.K., N.G. Kuvshinov, M.J. Melles, G.M. Doherty, A.C. Peterson, and E. Wimmer, "A Segment of The 5' Nontranslated Region of

26

- Encephalomyocarditis Virus RNA Directed Entry of Ribosomes During *In Vitro* Translation," *J. Virol.*, 62:2436-2443, 1988.
- Rao S. et al., "Particle Bombardment-Mediated Gene Transfer and Expression in Rat Brain Tissue", *BIOTECHNIQUES*, 11:492-502, 1991.
- Rapin, M.J., Leora, P., Samadpour, R.I., Sun, X., Pelt, D.W., O'Grady, K.L., and Daring, M.J. 1994. Long-term gene expression and phenotypic correction using adenovirus-associated virus vectors in the mammalian brain. *Nature Genetics* 8:144-154.
- Karlsson et al., *EMBO J.* 5:2377-2383, 1986.
- Karlsson et al., *Science*, 266:1373-1376, 1994.
- Koch, R.M., Stalder, M., Samadpour, R.I., Zhu, Z., Hunter, C.A., McLaughlin, S., Margulies, M., and Bressan, R.I. 1990. Site-specific integration by adenovirus-associated virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2218-2223.
- Korok, M., "At Least Six Nucleotides Preceding the AUG Initiator Codon Enhance Translation in Mammalian Cells," *J. Mol. Biol.*, 194:977-989, 1987.
- Korok, M., "Downstream Secondary Structure Facilitates Recognition of Initiator Codons by Eukaryotic Ribosomes," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:8393-8395, 1990.
- LaPine, D., Brummet, P., Whitehead, R., and Park, A. 1982. Gene transfer into hematopoietic progenitor cells mediated by an adenovirus-associated virus vector. *Virology*, 112:483-484.
- Laughlin, C.A., C.R. Castellino, and H.C. Chen, "Least Infection of KB Cells with Adenovirus-Associated Virus Type 2," *J. Virol.*, 68:515-524, 1986.
- Likhtovskii, L.K., McElroy, M.M., Chomaz, T.H., and Leach, L.B. 1983. Adenovirus-associated virus: a vector system for efficient introduction and integration of DNA into a variety of mammalian cell types. *Mol. Cell. Biol.* 3:3983-3994.
- Lodish, H. (1987). *J. Molecular Biol.* 118, 1.
- Li, T., M. Adelman, R. J. Bank, R.L. Berman, T.E. Doyle, R.J. Roeder, and R.L. Roeder. "In vivo Transfer of a Reporter Gene to the Brain Mediated by an Adenoviral Vector," *Anest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 33:2343-2348, 1994.
- Liu et al., *J. Biochem. (Tokyo)*, 118:13-17, 1993.
- Lowy et al., *CRC*, 22:817, 1980.
- Loeb, F., Zhou, S.Z., Chopra, R., Munch, N.C., Rowell, R.S., Benveniste, H.E., and Scheraga, A. 1994. Adenovirus-associated virus 2 mediated transfer and functional expression of a gene encoding the human glutathione-S-transferase catalytic subunit. *Gene*, 153:99-104, 1994.
- Margulies, M.G. and P. Sarnow, "Internal Initiation of Translation Mediated by the 5' Leader of a Cellular mRNA [see comments]," *Nature*, 353:94-96, 1991.
- McCurry, D.M., M. Christensen, and N. Margulies, "Sequences Required for Coordinate Initiation of Adenovirus-Associated Virus p19 and p40 Promoters by Rep Protein," *J. Virol.*, 65:2395-2405, 1991.
- McCurry, W.J., D.S. Benbow, and F.L. Ombres, "A Simple Technique for the Rescue of Early Region 1 Mutations into Infectious Human Adenovirus Type 5," *Protocols*, 163:614-617, 1992.
- McLaughlin, R.K., P. Collins, P.L. Brummet, and N. Margulies, "Adenovirus-Associated Virus-Catalyzed Transcription: Analysis of Protein Structures," *J. Virol.*, 62:1963-1973, 1988.
- Murphy et al., Third Cleveland Symposium on Microsatellites and Recombinant DNA, Editor A. Wilson, Glasgow, Australia, 1992.
- Miller 1992, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 158:1.
- Morla, J.A. and J.W. Hastings, "Theory Transfer to a Microsatellite System," *J. Cell Physiol.*, 77:313-318, 1971.
- Moshe et al., *Electron Microscopy*, 12:2356-2361, 1974.
- Mullins et al., *Nature*, 379:32, 1992.
- Mulligan et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78:2072, 1981.
- Margulies, M., "Use of Adenovirus-Associated Virus as a General Transduction Vector for Mammalian Cells," *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 158:97-123, 1992.
- Margulies, M. 1991. Use of AAV as a general transduction vector for mammalian cells. In: *Curr. Top. Microbiol. Immunol. Virol. Immunol. Vectors* (N. Margulies, ed.), vol. 153, pp. 99-123. Springer Verlag, Berlin.
- Nicola, C. et al. (1983). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 1003.
- Nicola and Stein, "Liposome-mediated DNA transfer in eukaryotic cells," *Biotechnol. Bioeng. Lett.*, 72:1185-1190, 1992.
- O'Hara et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71:1577, 1981.
- Oh, S., Bink, M., Tilley, M.K., and Ploek, S.G. 1994. Construction and replication of an adenovirus-associated virus expression vector that contains human  $\beta$ -globin cDNA. *Gene*, 152:279-282.
- Pollard and Rosenberg, "Internal Initiation of Translation of Eukaryotic mRNA Directed by a Sequence Derived from Poliovirus RNA," *Nature*, 304:320-323, 1986.
- Powers et al., *J. Biol. Chem.*, 263:7713-7716, 1988.
- Pines, "GFP in Eukaryotes," *TRENDS*, 16(5):326-327, August, 1993.
- Powers et al., "Enhancer-dependent expression of human  $\beta$ -globin genes introduced into mouse pro-B lymphocytes by electroporation," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:7151-7155, 1994.
- Prober, D.C., V.K. Redmond, W.W. Ward, F.G. Fundergast, and M.J. Chomaz, "Primary Structure of the Adenovirus Vector Gene-Fluorescent Protein," *Gene*, 111:229-233, 1992.
- Ridgway, "Microsatellite expression vectors," In: Rodriguez RL, Dambach RT, ed. *Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses*. Stockport: Butterworth, pp. 467-492, 1993.
- Rippe et al., "DNA-mediated gene transfer into adult rat hepatocytes in primary culture," *Mol. Cell Biol.*, 10:489-492, 1990.
- Witzke et al., "Chimeric gene-fluorescent protein as a tool for visualizing schedule responses in living cells," *Current Biology*, 5(9):615-622, 1995.
- Rosenfeld, M.A., Margulies, W., Yoshizawa, K., Yonemura, K., Polyanova, M., Siler, L.S., Peltier, R.K., Gilson, P., Stathopoulos, L.D., Parke, M., Bink, S., Parke, A., Leora, J.-P., and Crystal, R.G. *Science*, 252:631-634, 1992.
- Rosenfeld, M.A., Yoshizawa, K., Tagami, B.C., Yonemura, K., Stathopoulos, L.S., Leora, J.-P., Polyanova, M., Bink, S., Peltier, R.K., Gilson, P., Stathopoulos, L.D., Parke, M., Bink, S., Parke, A., Leora, J.-P., and Crystal, R.G. *Cell*, 68:143-153, 1992.
- Ryan et al., "Sequence Requirements For Binding of Rep68 to the Adenovirus-Associated Virus Terminal Repeats," *J. Virol.*, 1991.
- Sambrook et al. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, NY.
- Samuel, R.J., L.S. Chang, and T. Shink, "Highly Pure Stocks of Recombinant Adenovirus-Associated Virus: Normal Integration Does Not Require Viral Gene Expression," *J. Virol.*, 63:3223-3228, 1989.
- Samuel, R.J., Ross, R.L., Tan, M., and N. Margulies (1992) Cloning of AAV into pBR322: Rescue of Infectious Virus from the recombinant plasmid in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:2077-2081.
- Samuel, R.J., Chang, L.S., and Shink, T. 1993. High-purity stocks of recombinant adenovirus-associated virus: Normal integration does not require viral gene expression. *J. Virol.*, 67:3223-3228.
- Samuel, R.J., Tan, M., Ross, R.L., Shink, T.D., Hargrave, D.R., Epstein, N., and Farnsworth, L.A. 1991. Targeted integration of adenovirus-associated virus (AAV) into human chromosomes 19, 21, and 22. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:3941-3945.
- Stark et al., *Gene*, 102:147, 1984.
- Shilling, A.M., and Smith, M.O. 1994. Targeted integration of transduced and infected adenovirus-associated virus vectors containing the neomycin resistance gene. *Gene Therapy*, 1:165-169.
- Starkman, G., "Properties of the Chromosomes of the Adenovirus Gene-Fluorescent Protein," *FEBS Lett.*, 194:229-232, 1979.
- Shink and Bink, *Methods Enzymol.*, 194:303-312, 1991.
- Shink, R.O., D.S. Ben, T. Ni, X. Xue, R.L. Samuel, and N. Margulies, "Properties of The Adenovirus-Associated Virus Origin Involved in Substrate Recognition by the Viral Rep Protein," *J. Virol.*, 67:6294-6304, 1993.
- Stewart et al., 1990, *Hum. Gene Ther.* 1:263.
- Stathopoulos, L.D., Leora, J.-P., Chomaz, M., and Bink, S., *Hum. Gene Ther.*, 1:241-253, 1990.
- Stathopoulos, L.D., Mohr, L., Parke, M., and Bink, P. *J. Clin. Invest.*, 90:626-630, 1992.
- Stratton et al., *Molecular Biology of the Cell*, 3:221, 1992.
- Surguchov and Ward, *Photochem. Photobiol.*, 45:625, 1985.



[illegible]

(2) 配列の特徴：  
①長さ：6アミノ酸  
②型：アミノ酸  
③順の数：  
④トポロジー：直鎖状

電話2000-505530

(1) 配列の得点：  
(A) 長さ：17塩基対  
(B) 型：純粋

④ トボロター：■





[21]

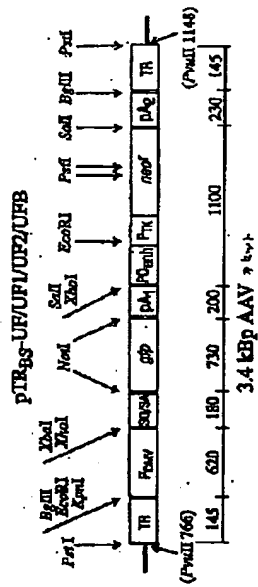


FIG. 2B-1

[21]

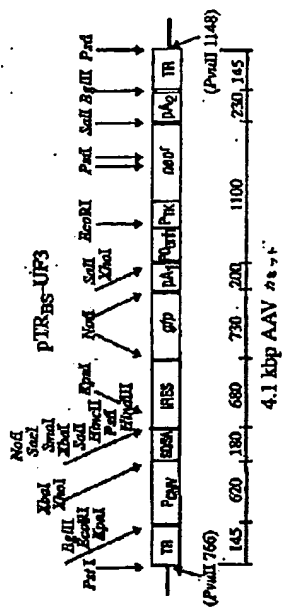


FIG. 2B-2

[22]

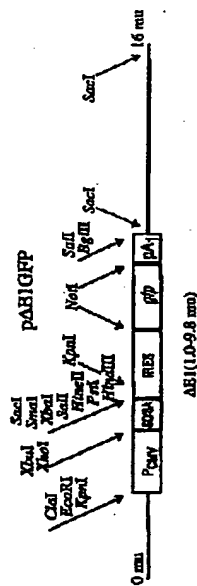


FIG. 2B-3

[23]

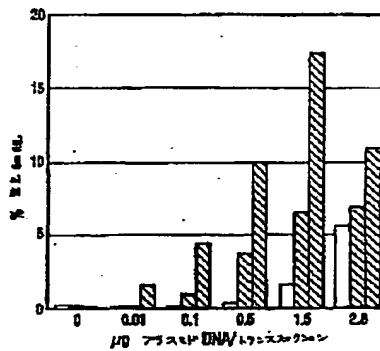


FIG. 3

[141]

FIG. 4A

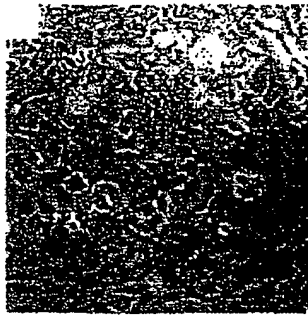
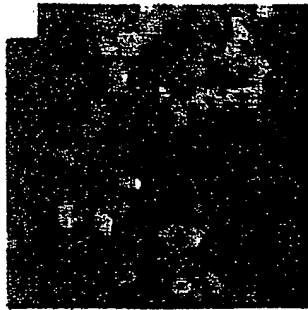


FIG. 4B



[143]

33

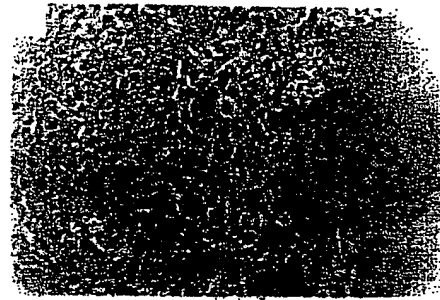


FIG. 5A

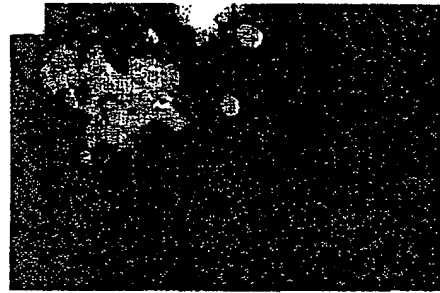


FIG. 5B

[145]

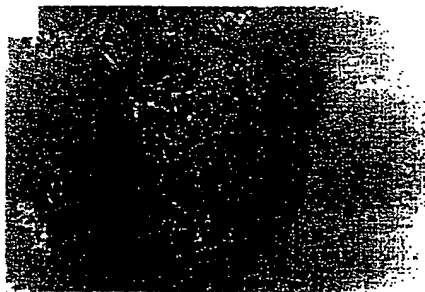


FIG. 5C



FIG. 5D

[146]

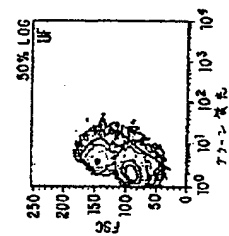


FIG. 6B

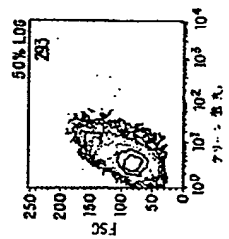


FIG. 6A

[146]

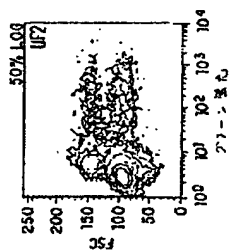


FIG. 6D

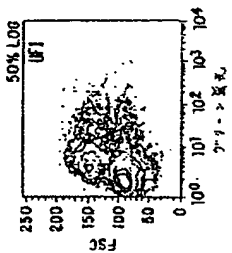


FIG. 6C

[147]

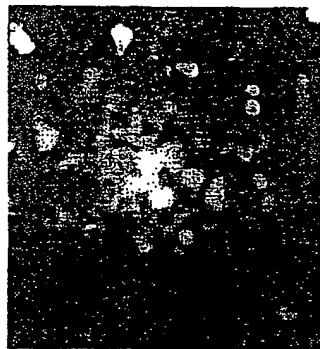


FIG. 7

[148]

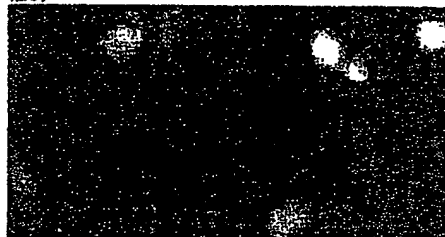


FIG. 8

[149]

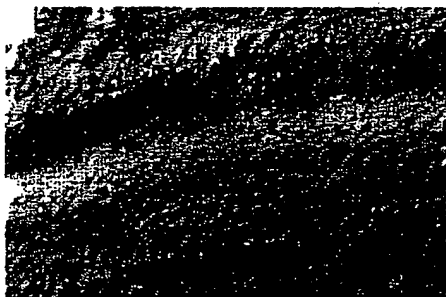


FIG. 9A



FIG. 9B

[150]



FIG. 9C



FIG. 9D





2  364

Number = [ AY004213 ]

LOCUS AY004213 954 bp DNA linear SYN 28-JUL-2000  
DEFINITION Synthetic construct luciferase (cluc) gene, complete cds.  
ACCESSION AY004213  
VERSION AY004213.1  
KEYWORDS  
SOURCE Renilla reniformis  
ORGANISM synthetic construct  
artificial sequences.  
REFERENCE 1 (bases 1 to 954)  
AUTHORS Ferbitz, L., Deininger, W., Fuhrmann, M. and Hegemann, P.  
TITLE A synthetic gene coding for Renilla luciferase is a versatile  
expression marker in green algae  
JOURNAL Unpublished  
REFERENCE 2 (bases 1 to 954)  
AUTHORS Ferbitz, L., Deininger, W., Fuhrmann, M. and Hegemann, P.  
TITLE Direct Submission  
JOURNAL Submitted (04-JUL-2000) Institut fuer Biochemie, Universitaet  
Regensburg, Universitaetstr. 31, Regensburg 93040, Germany  
FEATURES  
Location/Qualifiers  
source 1..954  
/organism="synthetic construct"  
/mol\_type="genomic DNA"  
/db\_xref="taxon:32630"  
/focus  
source 11..946  
/organism="Renilla reniformis"  
/mol\_type="genomic DNA"  
/db\_xref="taxon:6136"  
gene 11..946  
/gene="cluc"  
CDS 11..946  
/gene="cluc"  
/EC\_number="1.13.12.5"  
/codon\_start=1  
/transl\_table=11  
/product="luciferase"  
/protein\_id="AAF93188.1"  
/db\_xref="GI:9739244"  
/translation="MASKVYDPEQRKRMITGPQTHARCKQNNVLDSEFINYYDSEKHAE  
NAVIFLHGMNAASSYLNRHVPHIEPVARCIIPDLIGMGKSGKSGNGSYRLLDHYKYLT  
ANFELLNLPKKIIIFVGHIDWBAFLAFHYSYEHQDKIKAIIVHAESYVDVIESWDENPDIE  
EDIALIKSEEGEKQVLENNFFVETMLPSKIMRKLEPEEFAAYLEPFKEKGEVRRPTLS  
WPREIPLVKGKQPDVVQIVRNYNAYLRASDLPKMFIESDPGFFSNAIVEGAKKFPWT  
EFVKVGLHFSQEDAPDEGKYIKSFVERVLKNDT"  
BASE COUNT 217 a 298 c 298 g 141 t  
ORIGIN  
1 gatactcgag atggccagca aggtgtacga ccccgagcag cgcagcgca tgatcacgg  
61 ccttcagtg tggctcgt gcaagcagat gaacgtgtg gacagottca tcaactacta  
121 cgacagcgag aagcacgccg agaagcgcgt gatcttctg caccgcaacg ccgccagcag  
181 ctacctgtg cgccacgtg tgccccacat cgagcccggt gcccgctgca tcatccocga  
241 cctgctggc atggccaaga gggccaagag cgcacacggo agctaocgco tcttggaaca  
301 ctacaagtac ctgaccgcot gtttcagct gctgaacctg cccaagaaga tcatcttctg  
361 gggccaagaa tggcgccgt ccttgccctt ccaactacag tacgagcccc aggaacagat  
421 caagcccatc gtccacgccg agagcgtggt gacgtgato gagagctggg acgagtgcc  
481 cgacatcgag gaggacatcg cccgatcaa gacgaggag ggcgagaaga tggctctgga  
541 gaacacatc itcgtggaga ccatgctgcc cagcaagatc atgcgcaago tggagccgga  
601 ggagttcgcc gcttacctgg agcccttcaa gagaagggc gaggtgcgco gtccaccct  
661 gagctgacct cgcgagatcc ccttggtgaa gggcggaag cccgacctg tgcagatcgt  
721 ggcacactac aacgcotaco tgcgcgccag cgacgacctg cccaagatgt tcatcgagag  
781 agaccccgga ttcttcagca acgcatcgt gaggcgccg aagaagtcc caacacccga

841 gticgtgaag gtgaaggcc tgcattcag ccaggaggac gctccgacg agatgggcaa  
901 gtacatcaag agcttcgtgg agcgcgtgt gaagaacgat acgtaaggat cccg

//

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☒ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☒ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**